SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス (2009 pandemic A/H1N1) の迅速検出：基礎研究から臨床研究へ

2009 年、新型インフルエンザ 2009 pandemic A/H1N1 が、国内においても急速な広がりをみせて、特に妊婦、小児および糖尿病や喘息等の基礎疾患がある患者においては、早期の診断が緊急に求められた。既存の簡易診断キットでは、A 型ウイルスか B 型ウイルスかを判定することは出来るが、新型と季節性の区別を判定することは出来なかった。そのため医療現場で迅速に診断することができず、新型インフルエンザウイルスの感染による脳症や肺炎の重篤な症例や患者の死亡例が報告された。そこで理化学研究所オミックス基盤研究領域は、臨床での診断に適用できるキットを作製することを目的として、新型インフルエンザウイルスの迅速検出方法を開発した。

研究の概要

(1) キットの開発
理化学研究所が開発した SmartAmp 法を用いて、大阪府立公衆衛生研究所で採取された検体で評価し、新型インフルエンザウイルスを迅速に検出できるキットを開発した。

(2) 有効性の検証
大阪府立公衆衛生研究所、東京大学医科学研究所、神奈川県衛生研究所、横浜市衛生研究所等の協力を得て、新型インフルエンザウイルス陽性と判断された検体および単離培養ウイルス株を用いて交叉反応性を試験し、迅速検出キットの感度・特異性などの有効性を検証した。

(3) 臨床研究の実施
倫理委員会で承認を得て理研と共同研究契約を締結した７箇所の病院において、開発した迅速検出キットを試験し、臨床現場でその性能を検証した。

尚、本研究は、平成２１年度科学技術振興調整費：重要政策課題への機動的対応の推進プログラム「新型インフルエンザ対策に資する緊急研究」と理化学研究所オミックス基盤研究領域の運営交付金によって実施された。

（文責：石川智久）

理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域
石川智久、川井雄輝、金森基、木村恭将、臼井健悟、石津有里、Jean-Etienne Morlighem、花見健志、相馬崇裕、石田尾武文、Alexander Lezhava、向後泰司、三谷康正、片山敦子、青木伸太郎、遠藤竜太、高橋由香里、佐賀聡美、馬場将、花見光江、Amadu Jallo、小川ちひろ、中村久美、中村香菜、安部絵美、木嶋真美、荒川貴博、眞鍋理一郎、河合純、林崎良英

東京大学医科学研究所
河岡義裕、岩附研子、坂井優子

大阪大学微生物病研究所　感染症国際研究センター
中屋隆明、大道寺智

神奈川県衛生研究所
岡崎則男、古屋由美子、齋藤隆行

横浜市衛生研究所
蔵田英志、川上千春、宇宿秀三、池淵守

国立国際医療研究センター
工藤宏一郎、泉信有

千葉県立東金病院
平井愛山、林栄治、今村茂樹、古垣斉拡、鶴岡成一、外口徳美致

山武郡市診療所
天野豊（天野内科クリニック）、伊藤俊夫（伊藤医院）、岡崎信彦（岡崎医院）、金子昇（松尾クリニック）、加部恒雄（山武市日向診療所）、佐久間猛（佐久間医院）、佐藤成信（北辰堂佐藤医院）、高橋一（高橋医院）、田畑陽一郎（医療法人明生会）、西田泉（西田医院）、埴谷一夫（はにや内科）、古川洋一郎（古川クリニック）

いすみ医療センター
伴俊明、川野英一郎、齊藤美朝

大阪府立公衆衛生研究所
高橋和郎

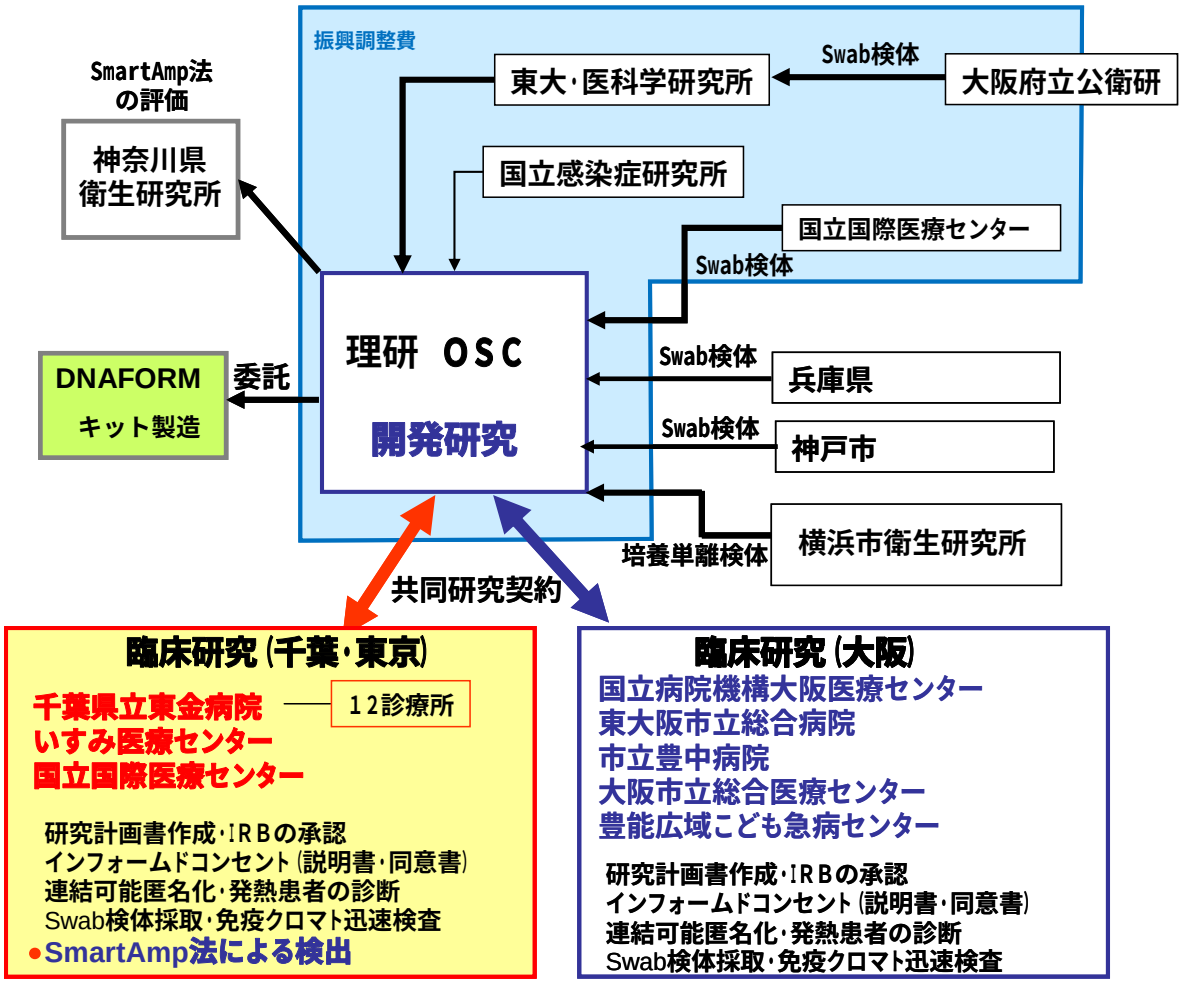
国立病院機構大阪医療センター
是恒之宏、和田晃、眞能正幸、坂本泰一、森下典子

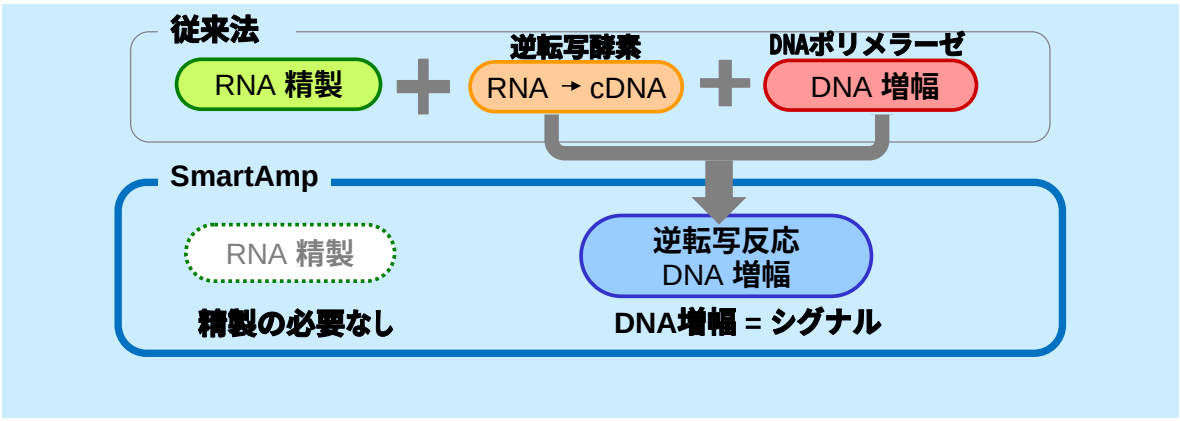
市立豊中病院
片桐修一、福永恵

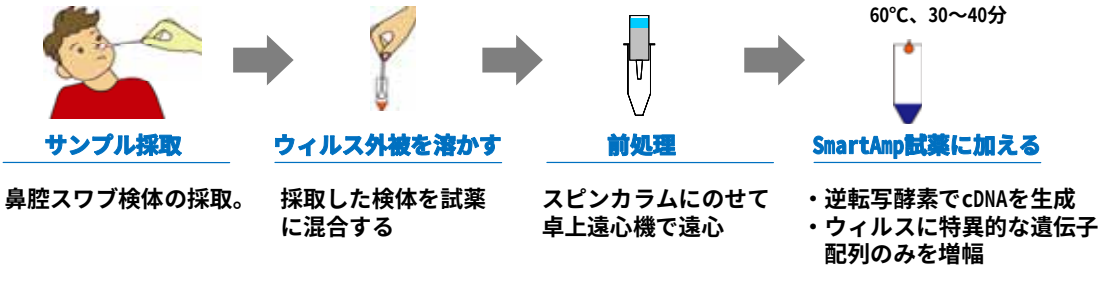
東大阪市立総合病院
波多丈、木島祥行、野村剛久

大阪市立総合医療センター
塩見正司、井上薫、室谷有利子

研究の全体像


振興調整費
SmartAmp法の評価
神奈川県衛生研究所
東大･医科学研究所
Swab検体
大阪府立公衛研
国立感染症研究所
国立国際医療センター
Swab検体
理研 OSC
開発研究
DNAFORM
キット製造
委託
Swab検体
兵庫県
Swab検体
神戸市
培養単離検体
横浜市衛生研究所
共同研究契約
臨床研究（千葉･東京）
千葉県立東金病院
いすみ医療センター
国立国際医療センター
12診療所
研究計画書作成･IRBの承認
インフォームドコンセント（説明書･同意書）
連結可能匿名化･発熱患者の診断
Swab検体採取･免疫クロマト迅速検査
●SmartAmp法による検出
臨床研究（大阪）
国立病院機構大阪医療センター
東大阪市立総合病院
市立豊中病院
大阪市立総合医療センター
豊能広域こども急病センター
研究計画書作成･IRBの承認
インフォームドコンセント（説明書･同意書）
連結可能匿名化･発熱患者の診断
Swab検体採取･免疫クロマト迅速検査


従来法
RNA 精製
逆転写酵素
RNA → cDNA
DNAポリメラーゼ
DNA 増幅
SmartAmp
RNA 精製
精製の必要なし
逆転写反応
DNA 増幅
DNA増幅 = シグナル


60℃、30～40分
サンプル採取
鼻腔スワブ検体の採取。
ウィルス外被を溶かす
採取した検体を試薬に混合する
前処理
スピンカラムにのせて卓上遠心機で遠心
SmartAmp試薬に加える
・逆転写酵素でcDNAを生成
・ウィルスに特異的な遺伝子配列のみを増幅

1. 研究の要約

理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域(OSC)において我々は、ヒト由来検体（鼻腔ぬぐい液検体）を用いて、SmartAmp 法により、ウイルスの検出・同定を迅速簡便に実施できるシステムの開発に取り組んだ。同時に、DNA シーケンサーによってウイルスの塩基配列を決定し、SmartAmp 法などによるウイルス検出の結果と比較し、その正確さを検証した。さらに臨床研究を実施することによって、SmartAmp 法に基づく新型インフルエンザ(2009 pandemic influenza A /H1N1)ウイルスの迅速検出技術を検証し、臨床現場で活用できるキットを開発することを目指した。

SmartAmp 法は、オミックス基盤研究領域が開発した遺伝子検出法で、ターゲットとする配列の核酸のみを増幅させることにより、その存在を検出する方法である(文献 1,2)。本プロジェクトで開発したキットは、検体採取後、比較的簡単な手技で約 1 時間以内に新型インフルエンザウイルスに特有の遺伝子配列を増幅して検出することができるものである（図１）。この方法では、PCR 法のように温度を上下させる必要がないため、逆転写酵素反応と DNA 増幅反応（SmartAmp 反応）を同一のチューブで同時に行うことができ、且つ比較的簡単な装置で新型インフルエンザウイルスを検出することが可能である。

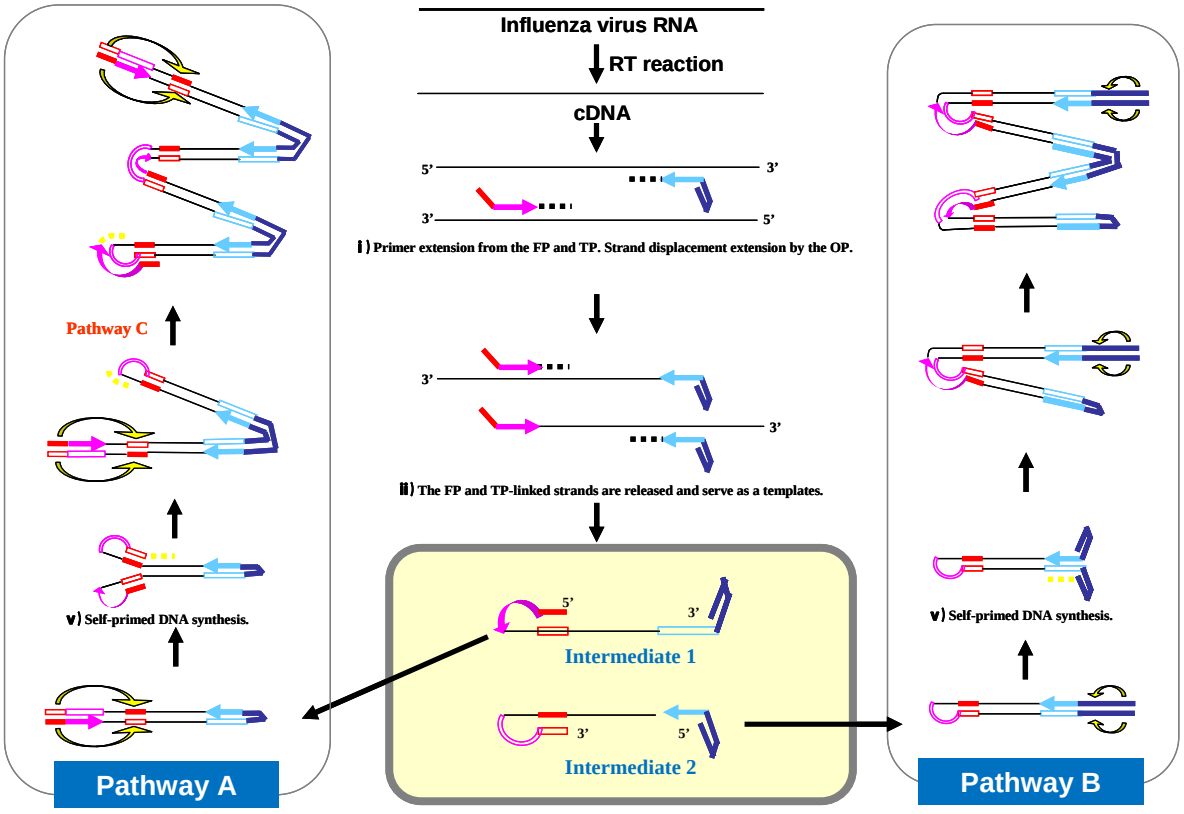


図１　SmartAmp 法による DNA 増幅の原理。インフルエンザウイルスのゲノム RNA を逆転写酵素反応(RT reaction)で cDNA に変換し SmartAmp 法で DNA を増幅する。

理化学研究所では、共同研究契約を締結した医療機関（大阪府立公衆衛生研究所、東京大学医科学研究所、神奈川県衛生研究所、横浜市衛生研究所）より免疫クロマト法で陽性と判断された患者の Swab 検体や、単離培養したインフルエンザウイルスの提供を受けて、それらの検体を用いて、新型インフルエンザウイルスの検出に最適のプライマーを調整した。その結果、SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の感度は従来の簡易検出キット（免疫クロマト法）の感度よりも 100 倍以上高く、且つ新型インフルエンザウイルスに特異的で、他のインフルエンザウイルス（季節性 A 型、B 型など）とは交叉反応しないことが判明した。

SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の有効性を臨床現場で検証するために、合計７か所の病院での自主臨床研究を実施した。その臨床研究は本研究プログラムの計画に追加した開発研究であり、理化学研究所の運営交付金に基づいて実施した。臨床研究において免疫クロマト法で陰性と判定された症例においても SmartAmp 法で新型 A インフルエンザ陽性と判定され、SmartAmp 法は免疫クロマト法に比較して新型 A インフルエンザウイルス(H1N1)を感度良く検出できると結論づけられた。発熱開始後 5 時間の場合でも、SmartAmp 法では新型 A インフルエンザ陽性として検出することができた。また、本法は、タミフル耐性ウイルスの直接検出も原理的に可能であることから、今後さらに開発を進め、臨床で真に役立つ技術として完成させる計画である。

今回の新型インフルエンザ(2009 pandemic A/H1N1)は、季節性インフルエンザと類似していると考えられていたものの、一部に重篤化する症例が報告された。全国の約 5,000 の医療機関から報告された患者数は、2009 年 10 月第 3 週で、15 万 9651 人、1 医療機関（定点）当たり 33.28 人となり、患者数のほぼピーク値となった。このうち PCR による遺伝子診断を行った患者の 98.7%が新型インフルエンザであった。

新型インフルエンザは、糖尿病や喘息等の基礎疾患がある患者等を中心に重症化する例が報告された。さらに抗インフルエンザ薬「タミフル」に耐性を持つ新型インフルエンザウイルスの検出は今年２月までに 61 例となった。いずれも単発例であり、周囲への感染拡大は認められていないものの、注意は必要であろう。国立感染症研究所は、「日本は新型インフルエンザの患者に対して広くタミフルを使用したことから、今後耐性ウイルスの比率が増えていくことが予想される」と注意をうながしている。事実タミフル耐性株については、2007/2008 シーズンに、季節性インフルエンザ A ソ連型に関して国内の耐性株の発生頻度は 2.6%だった。しかし、翌 2008/2009 シーズンには、99.7%に跳ね上がったという経緯がある。今回の我々の臨床研究において、タミフル耐性の患者が１人見つかり、その患者の鼻口腔ぬぐい液検体および気道分泌物においてタミフル耐性ウイルスの存在をシークエンス解析で確認した。したがって、今後、新型インフルエンザのタミフル耐性ウイルスの蔓延に備えて、迅速に検出する技術を開発しておく事は焦眉の急であろう。

2-1. 研究の背景

21 世紀は感染症の時代とも言われる。2009 年 3 月にメキシコで発生した豚由来の新型インフルエンザウイルスは、瞬く間に世界中に伝播した。同年 6 月には、世界保健機関（WHO）が、警戒水準（フェーズ）を最高度の「6」に引き上げ、世界的大流行（パンデミック）が発生したと宣言した。チャン事務局長は記者会見で「これは 2009 インフルエンザ・パンデミックである」と表明した。新型インフルエンザの大流行は 1968 年に発生した「香港風邪」以来 41 年ぶりであるという。我が国でも新型インフルエンザは急速な広がりをみせ、多くの感染者が出たのは記憶に新しい。かくして新型インフルエンザは「2009 pandemic A/H1N1」と命名され、歴史的に今世紀初の世界大流行インフルエンザとなった。

インフルエンザウイルスとは、オルトミクソウイルス科に分類されるウイルスのうち、A 型インフルエンザウイルス、B 型インフルエンザウイルス、C 型インフルエンザウイルスの 3 属を指す。特に、A 型は内部での変異型が多く世界的な大流行を起こしやすい。インフルエンザウイルス遺伝子は１本鎖 RNA である。A 型インフルエンザウイルスの RNA ゲノムは 8 個の分節(HA, NA, PA, PB1, PB2, M, NP, NS)からなる（図２）。

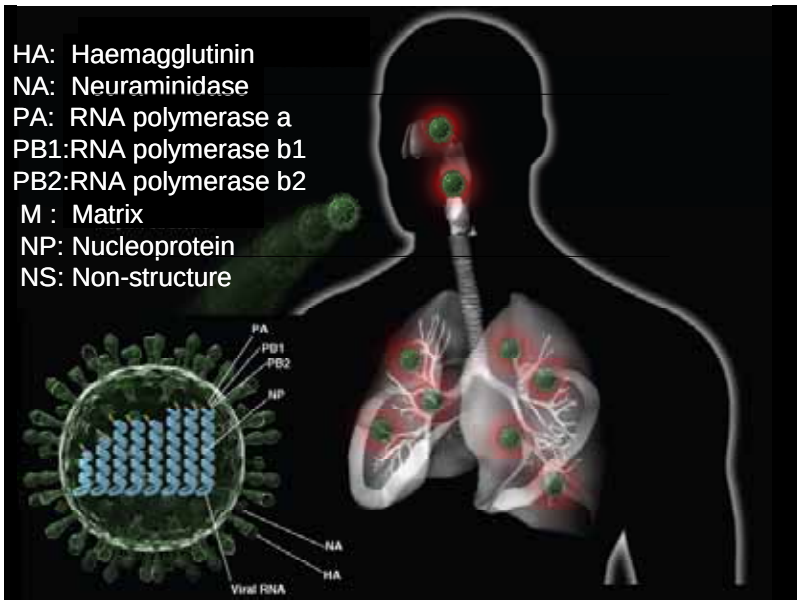


図２　A 型インフルエンザウイルスの構造を示す模式図

A 型インフルエンザウイルスでは、特に HA と NA のゲノムに変異が多く、これまで HA に 16 種類、NA に 9 種類の大きな変異が見つかっており、その組み合わせの数の亜型が存在しうる。亜型の違いは H1N1 - H16N9 といった略称で表現されている。ヒトのインフルエンザの原因になることが明らかになっているのは「A ソ連型」として知られている H1N1、「A 香港型」として知られている H3N2、H1N2、H2N2、の 4 種類である。この他に H9N1、高病原性トリインフルエンザとして有名になった H5N1 などのいくつかの種類がヒトに感染した例が報告されているが、ヒトからヒトへの伝染性が低かったため大流行には至っていない。しかし、いずれ新型インフルエンザが定期的に大流行を起こすことは予言されつづけてきた。

わが国においては、2009 年メキシコや米国等で確認された新しい豚由来インフルエンザ（A/H1N1）を感染症法第 6 条第 7 号に規定する新型インフルエンザ等感染症に位置づけ、感染の拡大を防止す様々な対応が国際的な連携のもとに進められてきた。新型インフルエンザは、その遺伝子が豚インフルエンザのものに似ていることから、確認当初は豚インフルエンザ(Swine A/H1N1)と呼ばれたが、その後の研究で、今回のインフルエンザウイルスが豚インフルエンザウイルスの遺伝子のほかに、鳥インフルエンザウイルス及びヒトインフルエンザウイルスの遺伝子も持つことが確認された（文献 3-5)。サルを用いた実験では、季節性インフルエンザウイルスは、咽頭や扁桃、気管、気管支、肺の一部で増殖したのに対して、新型インフルエンザウイルスは鼻粘膜、咽頭、扁桃、気管、気管支、肺のすべての部分で増殖することが確認された（文献 6)。また、季節性インフルエンザに比較して新型インフルエンザウイルスの方が 10 倍から 1 万倍程度感染力が強いと報告された（文献 6,7)。特に妊婦、小児および糖尿病や喘息等の基礎疾患がある患者においては、早期に医師が診断することが特に重要となる。しかし、従来広く使われている簡易検査法である免疫クロマトグラフィーでは、新型インフルエンザの 30%以上が偽陰性となると報告されており、早期に治療開始しなかったために重篤化した例があった。

簡易診断キット（免疫クロマトグラフィー法）は取扱が簡単であるが、新型インフルエンザウイルスに対する感度が低く、検体中にウイルス量が低い場合には、検出できない。さらに、新型 2009 pandemic A/H1N1 と季節性 A/H1N1 を区別することができない。一方、RT-PCR 法は高感度であり、新型インフルエンザ(2009 pandemic A/H1N1)の感染を確定診断するのに使用されている。しかしながら、患者の鼻腔ぬぐい液検体からウイルス RNA を抽出精製し、逆転写酵素(RT)反応を行った後、cDNA を増幅する PCR 反応を行わなければならず、手間と時間を要する。

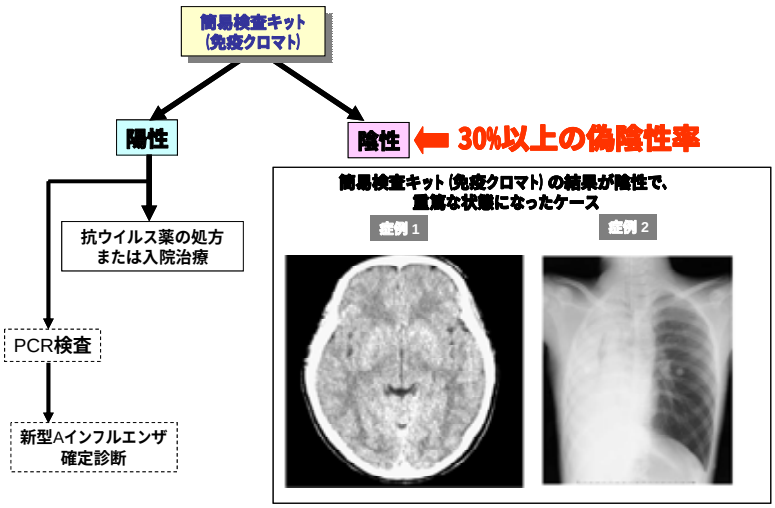


図 3 免疫クロマト検査で陰性と判定された場合の問題点
平成 21 年度厚生労働省科学特別研究
主任研究者　工藤宏一郎
「国内における新型インフルエンザ症例集」

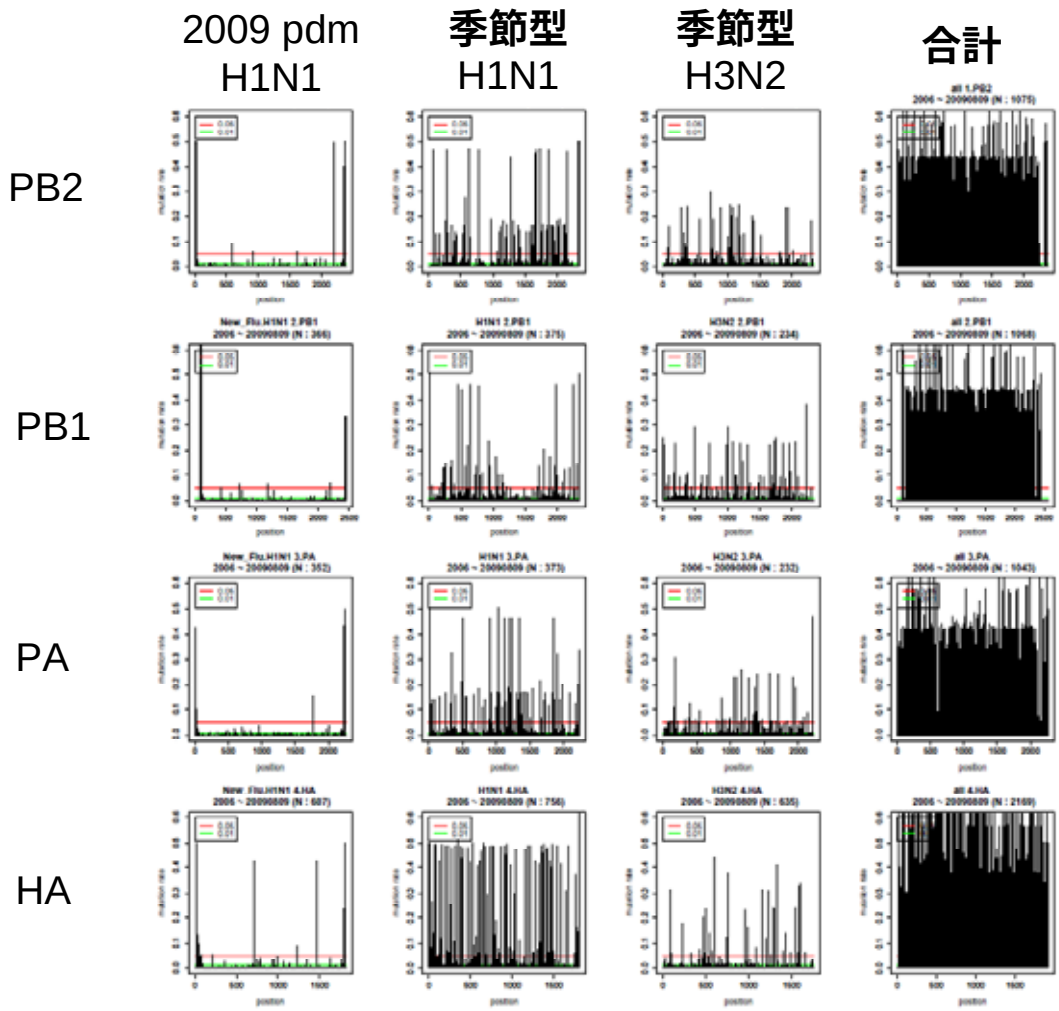
そこで、鼻腔ぬぐい液検体からウイルス RNA を抽出することなく、SmartAmp 法により、新型インフルエンザウイルスを迅速に且つ高感度に検出する方法を開発する事が緊急に求められた。ただし、その方法の開発には次のような研究開発のステップが必要である。(1)新型および季節性インフルエンザウイルスの変異データの収集、(2)SmartAmp 法プライマーが認識するウイルスのゲノム RNA の位置の探索、(3)SmartAmp 法プライマーの設計と最適化、(4)SmartAmp 法プライマーの新型インフルエンザウイルスに対する感度と特異性の検証、(5)臨床検体の前処理方法の確立、(6)新型インフルエンザウイルスを含む臨床検体を用いた retrospective な検証と他の方法（シ

ークエンス解析）との比較、(7)臨床現場における SmartAmp 法の prospective な検証（免疫クロマト法、シークエンス解析、RT-PCR 法との比較）、(8)SmartAmp 法によって得られた結果と臨床データとの関連付け、(9)地域の診療所でも使用できるキットと簡便な装置の開発。

特に研究開発のステップ(7)と(8)に関しては、臨床研究として医療機関の倫理審査委員会の承認を得て、共同研究契約を締結した上で実施する必要がある。実施にあたっては、文部科学省、厚生労働省および経済産業省において共同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」と厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年 7 月 31 日改正）」および「ヘルシンキ宣言（2008 年改訂）」を遵守して行った。

2-2．新型および季節性インフルエンザウイルスの変異データの収集

SmartAmp 法によって新型及び季節性インフルエンザウイルスを検出するには、ウイルスゲノム RNA のシークエンスデータを取得して、それに基づいて最適のプライマーを設計する必要がある。NCBI Influenza Virus Resource (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/SwineFlu.html)は、The NIAID Influenza Genome Sequencing Project および GenBank のインフルエンザウイルス・シークエンス解析データベースを公開するほかに、インフルエンザウイルスに関する文献時情報を提供している。



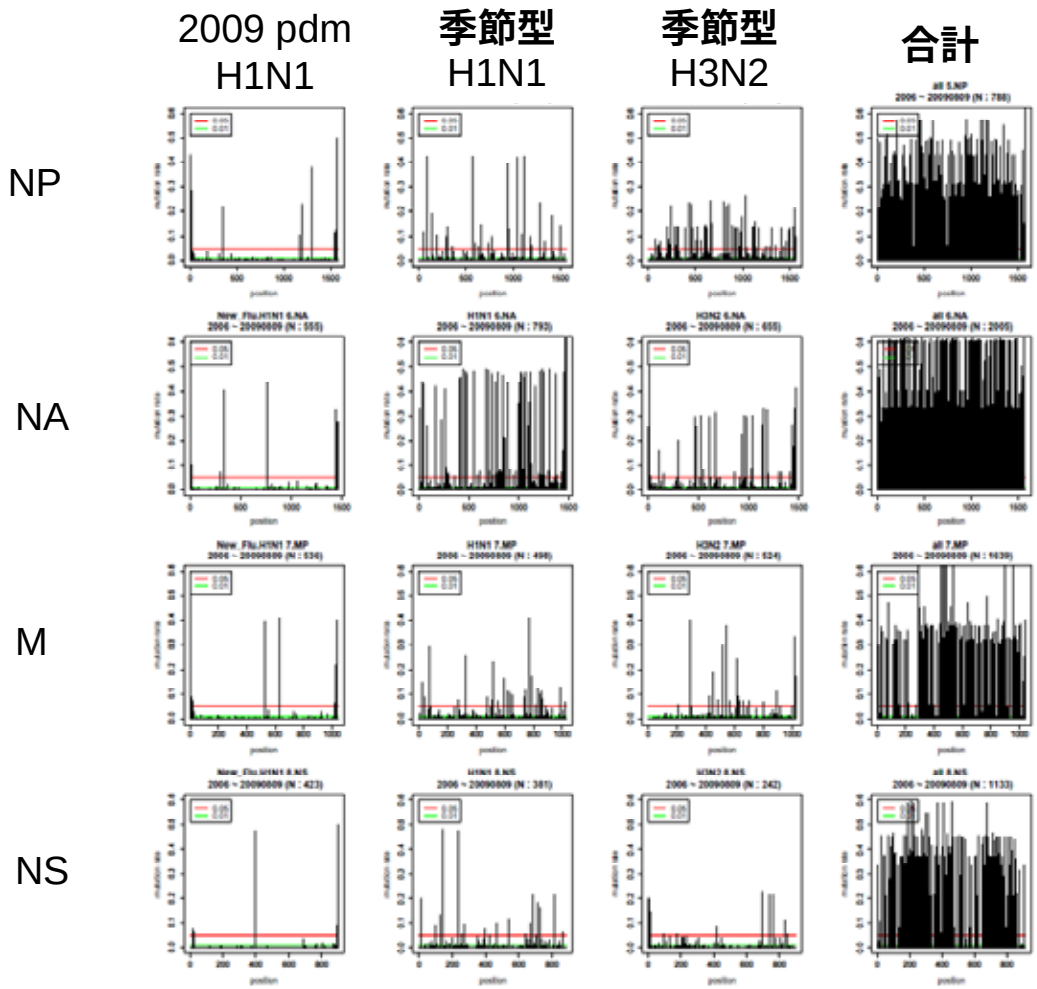


図４　新型インフルエンザ(2009 pdm H1N1)、季節性インフルエンザ(H1N1 と H2N2)の分節に起きた変異の位置と頻度（NCBI　Influenza Virus Resource のデータベースに基づく）

我々は NCBI　Influenza Virus Resource のデータベースに基づき、新型インフルエンザ(2009 pdm H1N1)、季節性インフルエンザ (H1N1 と H3N2) に関して８個の分節のシークエンスを解析し、それぞれの分節 RNA 上に起きた変異の位置と頻度をマップした。図４にその結果を示す。2009 年 8 月の時点において、新型インフルエンザ (2009 pdm H1N1) における変異は、季節性インフルエンザ(H1N1 と H3N2)の変異に比較して変異頻度は高くなかった。一方、季節性インフルエンザ(H1N1) の HA 分節と NA 分節においては、変異の種類と頻度が顕著に高かった。また、(2009 pdm H1N1)、季節性インフルエンザ (H1N1 と H3N2) に起きた変異を分節ごとに合計すると、ほとんどの領域で変異が起きていることが明らかである。ただし M 分節の塩基 200-250 番においては、変異が比較的少ないことが注目に値する。M 分節は、新型インフルエンザ (2009 pdm H1N1) と季節性インフルエンザ (H1N1 と H3N2) において共通する分節である。従って、新型と季節性の区別なく、A 型インフルエンザのウイルスを検出する際には、M 分節の変異が少ない領域にアニールするようにプライマーを設計する必要がある。

2-3. SmartAmp 法プライマーの設計（M 分節と HA 分節に特異的）

SmartAmp 法は非対称プライマーによる等温核酸増幅法であり、５つのプライマー（TP, FP, BP, OP1, OP2）を必要とする（図５）。これらのプライマーの設計は、インフルエンザウイルス検出の感度と特異性を決定する重要なファクターである。

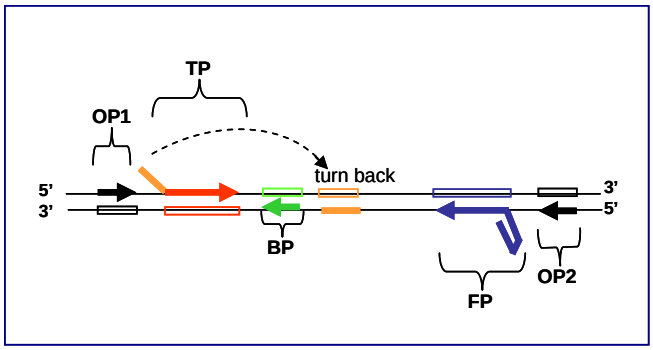


図５ SmartAmp 法のプライマー（TP, FP, BP, OP1, OP2）

TP, turnback primer; FP, folding primer; BP, boost primer; OP1, outer primer 1; OP2, outer primer 2

2-2 で記述したように、M 分節は、新型インフルエンザ(2009 pdm H1N1)と季節性インフルエンザ(H1N1 と H3N2)において共通する分節である。従って、新型と季節性の区別なく、A 型インフルエンザのウイルスを SmartAmp 法で検出できる。図 6 で示すように M 分節の変異が少ない領域にアニールするようにプライマーを設計した。ちなみに Center for Disease Control (CDC) の A 型インフルエンザウイルス検出用 TaqMan-PCR のプライマーも同様の領域に設計されている。

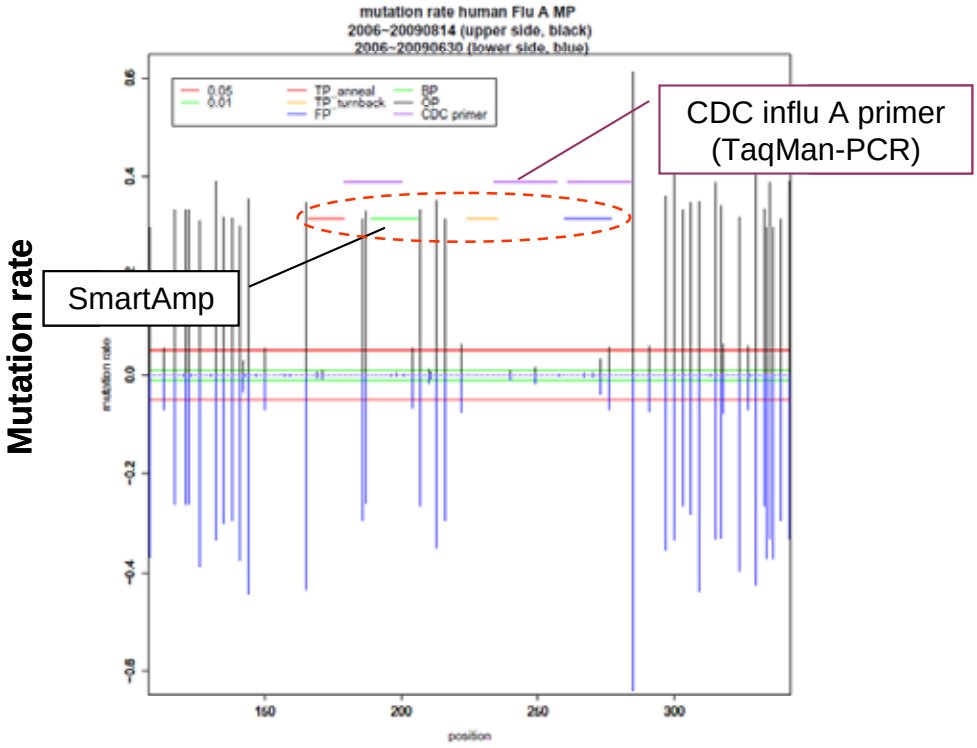


図６ A 型インフルエンザのウイルスを SmartAmp 法と TaqMan-PCR で M 分節を検出するためのプライマーの位置。2006 年～2009 年 6 月 30 日 および 2006 年～2009 年 8 月 14 日に収集した変異をそれぞれ青色と黒色の縦筋で示す。縦筋の長さは変異の頻度を反映する。

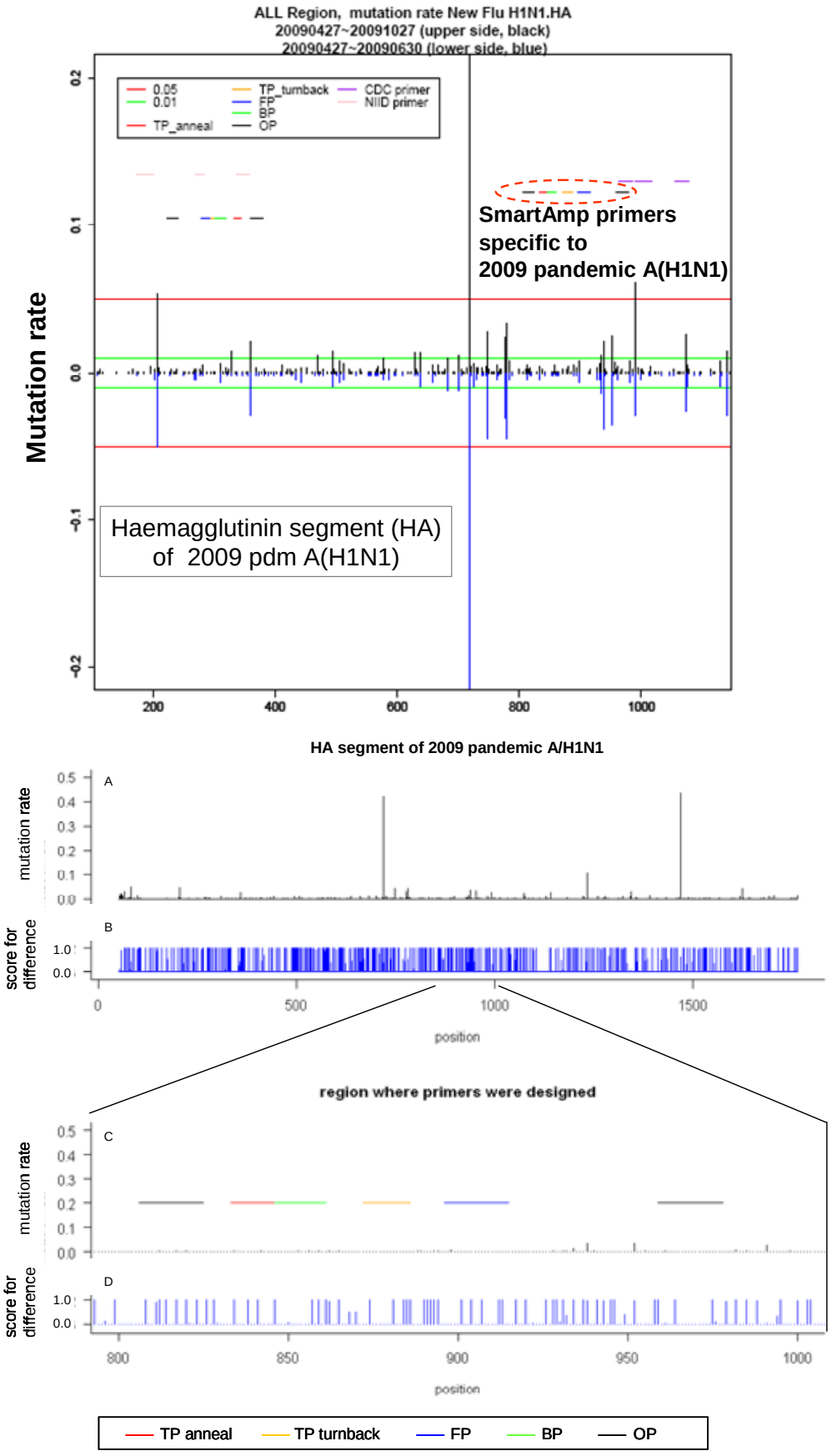


図7　新型インフルエンザウイルス HA 分節を検出する SmartAmp プライマーの位置

A 型インフルエンザウイルスの HA 分節は、亜型によってゲノム RNA の塩基配列が異なる。従って新型インフルエンザウイルス 2009 pdm A/H1N1 と季節性インフルエンザウイルス(H1N1 と H3N2)を区別し、且つ新型インフルエンザウイルスを特異的に SmartAmp で検出するためには、HA 分節を選択的に認識する高感度プライマーを設計する必要がある。図７は、SmartAmp 検出用に設計した５つのプライマー（TP, FP, BP, OP1, OP2）がアニールする位置を示す。これらのプライマーを設計するには、２つの条件を満たすことが前提条件である：(1) 新型インフルエンザウイルスの HA 分節で変異が少ない領域。(2) 新型インフルエンザウイルスの HA 分節と季節性インフルエンザウイルスの HA 分節とシークエンスの異なる領域（図７Score of difference が密）。

2-4. SmartAmp プライマーの最適化

こうして選んだプライマー候補を実際の SmartAmp 法反応でテストして最適化を実施した。新型インフルエンザウイルスの HA 分節および M 分節の標準的塩基配列をコードする DNA 作成し、それをベクターにインサートして鋳型とした。そしてコピー数の異なったサンプルを調製して、SmartAmp 反応を行なった。図８上段に HA 分節検出の反応曲線（蛍光強度の時間経過）の例を示す。反応溶液（25 μL）に 30 コピー以上あれば、SmartAmp 法で検出できる可能性が示された。しかしながら、ゼロ・コピー数で偽反応が現れたので、さらにプライマーの最適化を繰り返してバックグラウンドを抑制した。こうして得られたプライマーは、反応時間 40 分で高感度に新型インフルエンザウイルスの HA 分節を検出することができた（図８下段）。

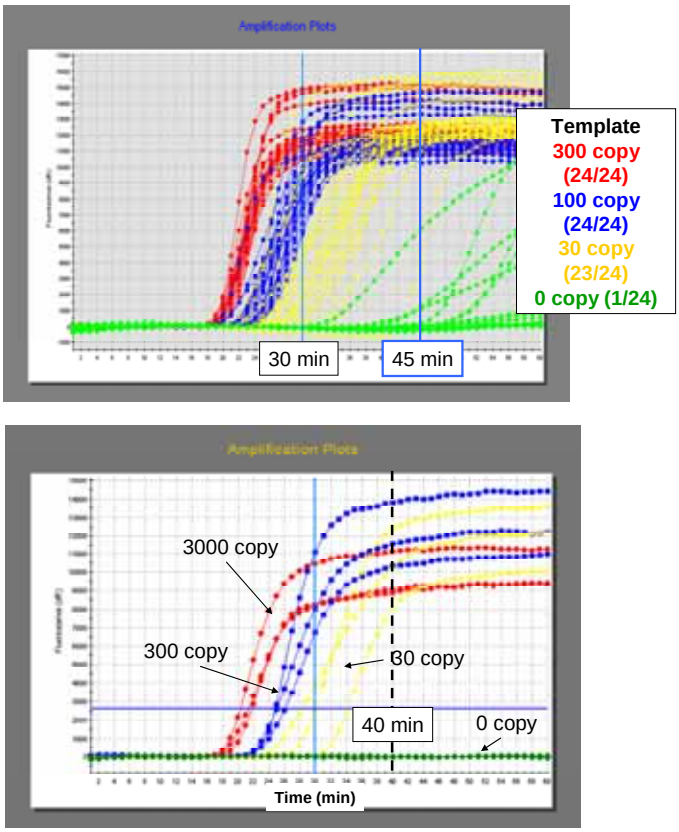


図８　コピー数が異なる HA 分節の SmartAmp 法による検出

2-5. Exciton dye プライマーの開発と安全性確認

理化学研究所・基幹研究所の岡本晃充・独立主幹研究員が開発した Exciton dye (文献 8)を SmartAmp プライマーに導入させる事により、蛍光観測によって DNA 増幅反応を測定できるようになった（文献９）。SmartAmp プライマーは鋳型 DNA にハイブリダイズしていない場合、一本鎖 DNA である。その際、枝分かれした二分子の Exciton dye が相互作用して複合体を形成し、紫外線で Exciton dye を照射しても分子同士のエネルギー遷移のため蛍光を発しない。しかしながら、SmartAmp プライマーが鋳型 DNA にハイブリダイズして、DNA ポリメラーゼ反応によって二重鎖 DNA が形成されると、二分子の Exciton dye が二本鎖 DNA の塩基対の間に介入する。そうすると二分子間の quench 効果がなくなり、紫外線照射によって強い蛍光を発する。図９は Exciton dye の化学構造式と蛍光を発する分子機構を模式的に示す。Exciton dye の蛍光は、広く使われている SYBR Green Ⅰの蛍光よりも強力でありバックグランド蛍光は低い。即ち、Exciton dye ではシグナル／ノイズ比（S/N 比）が良好である。したがって本研究において、SmartAmp 法による新型インフルエンザの検出に Exciton dye プライマーを使用した。

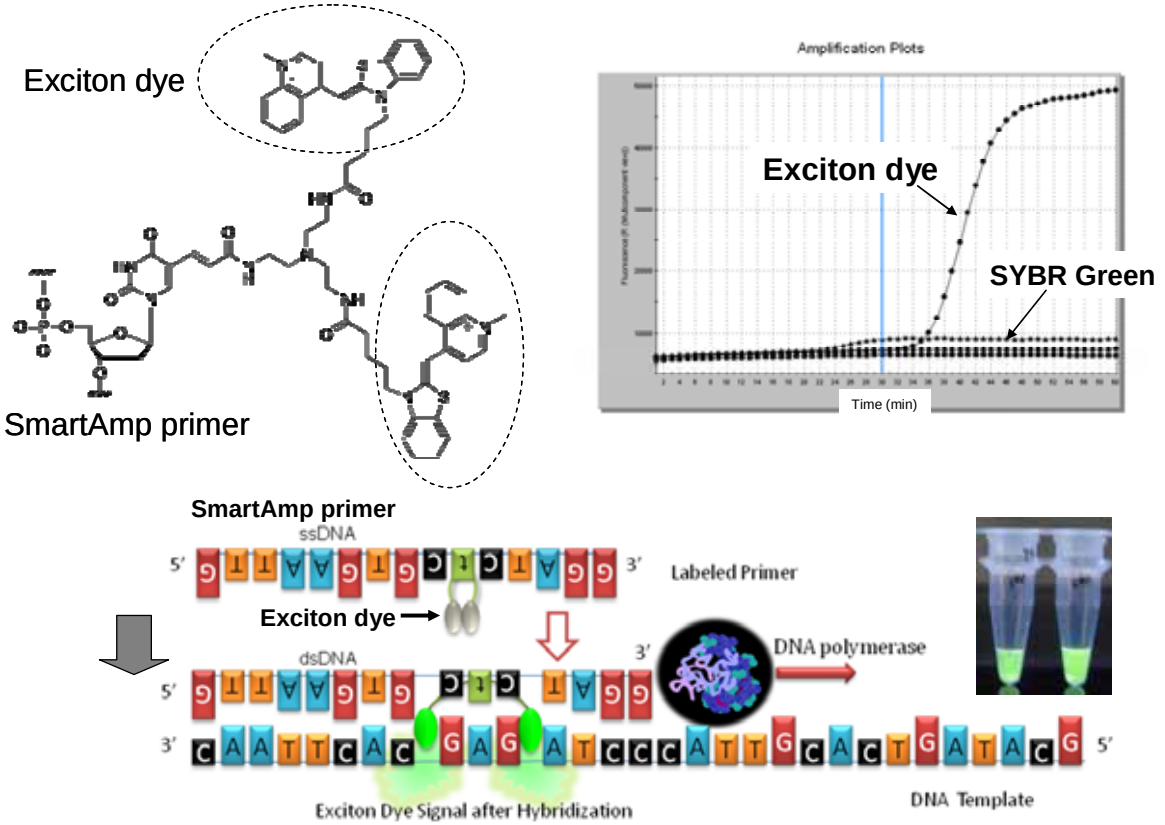


図９　Exciton dye の構造式と蛍光を発する分子機構

Exciton dye が二本鎖 DNA の塩基対の間に介入する性質を持つために、Exciton dye プライマー使用上の安全性を検証した。安全性試験は株式会社化合物安全性研究所に委託し、GLP 基準の下、細菌(*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP*uvr*A)を用いた復帰突然変異試験によって検討した。試験の結果、用量設試験および本試験ともに、用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加は認められず、結果は陰性だった。即ち、Exciton dye プライマーの安全性が確認・担保された（化合物安全性研究所　最終報告書　試験番号 SR09136）。

2-6. 臨床検体の前処理操作の検討

インフルエンザウイルスの殻には HA(ヘマグルチニン)と NA(ノイラミニダーゼ)という 2 つの糖タンパクがあり、ゲノム RNA はその殻の中に存在する（図２）。RT 反応と SmartAmp 反応に進めるためには、加熱または界面活性剤などによる前処理で、インフルエンザウイルスのゲノム RNA を殻の中から取り出すことが必要である。また、SmartAmp 反応にかける臨床検体は鼻腔ぬぐい液であり、インフルエンザウイルス以外にも患者の鼻腔粘膜細胞やその破砕物や、鼻腔に棲息する細菌など、さまざまな物質が混在している。さらに鼻腔ぬぐい液検体中には、SmartAmp 反応を阻害する物質が混在しているので、混在物質を除く必要がある。そのために我々は簡単な前処理操作を開発した。スピンカラムを用いることにより、前処理した検体の溶液の中からウイルスゲノム RNA を部分抽出することに成功した。図 10 に示すように、前処理用スピンカラムを準備する。

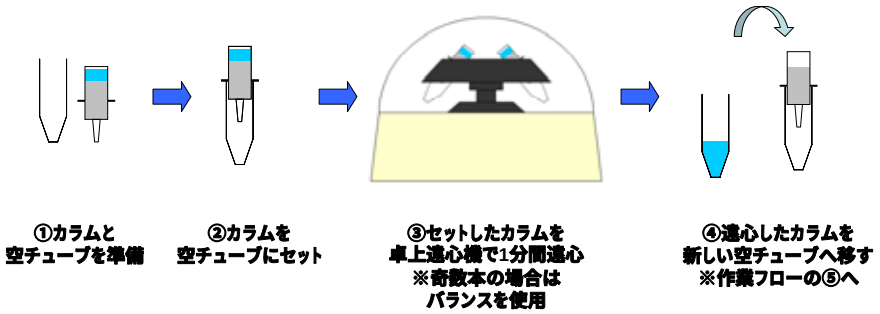


図 10　前処理用スピンカラムの準備

Swab 検体の前処理は、図 11 が示すように実施する。Swab 検体を前処理液（内容物は非公開）の中で攪拌して、インフルエンザウイルスを Swab の繊維から解離させて前処理液中に懸濁させる。そしてその懸濁液の一部(15 μL)を取り出し、準備したスピンカラムに添加する。卓上遠心機でスピンカラムを遠心して、溶出した液を確保する。その溶出液の一部(5 μL)を SmartAmp 法の反応液と混ぜてウイルスの検出をおこなう。

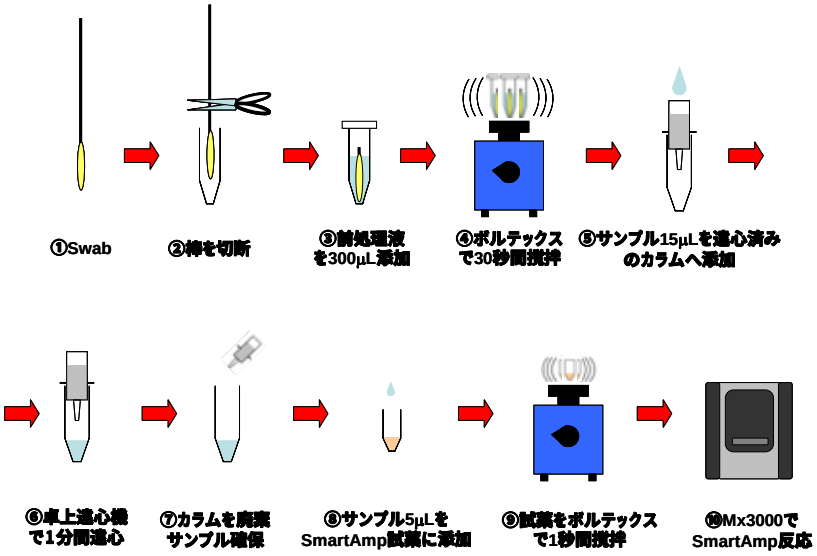


図 11　Swab 検体の前処理から SmartAmp 法による検出までの操作手順

2-7. 呼吸器感染性ウイルスおよび細菌との交叉試験

理化学研究所が開発した SmartAmp 法プライマーが、新型インフルエンザウイルス(2009 pdm A/H1N1)に対して特異的であることを検証する必要がある。そのために、新型インフルエンザウイルスのほかに、神奈川県衛生研究所が管理・保存している呼吸器感染性 44 種類のウイルスおよび 22 種類の細菌株を用いて交叉反応試験を実施した。交叉反応試験は、上述したヒト由来試料（鼻腔ぬぐい液検体）を用いて新型インフルエンザウイルスの検出を行う手順に従い、SmartAmp 法キットの３種類の Lot で検証した。本交叉試験は、神奈川県衛生研究所で実施した。そのために同研究所の倫理審査委員会（2010 年 1 月 22 日開催）の承認を得て実施した。
（ウイルスは全て臨床分離株。細菌に関して、〇印は標準株で、それ以外は臨床分離株。）

表１　交叉反応試験の対象としたウイルスおよび細菌の種類

	交叉反応性供試ウイルス
0	2009 pandemic H1N1 Influenza virus
1	Adenovirus Type 1
2	Adenovirus Type 2
3	Adenovirus Type 3
4	Adenovirus Type 4
5	Adenovirus Type 5
6	Adenovirus Type 6
7	Adenovirus Type 7
8	Adenovirus Type 8
9	Adenovirus Type 11
10	Adenovirus Type 19
11	Adenovirus Type 37
12	Coxsackievirus Type A2
13	Coxsackievirus Type A4
14	Coxsackievirus Type A5
15	Coxsackievirus Type A6
16	Coxsackievirus Type A8
17	Coxsackievirus Type A9
18	Coxsackievirus Type A10
19	Coxsackievirus Type A12
20	Coxsackievirus Type A14
21	Coxsackievirus Type A16
22	Coxsackievirus Type B1
23	Coxsackievirus Type B2

24	Coxsackievirus Type B3
25	Coxsackievirus Type B4
26	Coxsackievirus Type B5
27	Echovirus Type 3
28	Echovirus Type 6
29	Echovirus Type 9
30	Echovirus Type 11
31	Echovirus Type 13
32	Echovirus Type 14
33	Echovirus Type 18
34	Echovirus Type 30
35	Enterovirus Type 71
36	Parecho virus Type 1
37	Rhin virus
38	Parainfluenza virus Type 3
39	Mumps virus
40	Herpes Simplex virus Type 1
41	Influenza virus Type A (H1)
42	Influenza virus Type A (H3)
43	Influenza virus Type B
44	Parechovirus Type 3

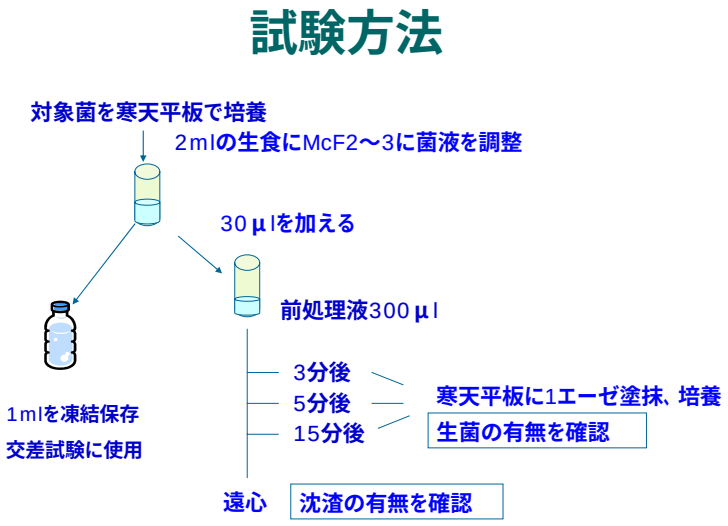
交叉反応性供試細菌

45	Bordetella pertussis
46	Enterococcus faecalis ○
47	Enterococcus gallinarum ○
48	Escherichia coli ○
49	Haemoohilis influenzae ○
50	Klebsiella pneumoniae ○
51	Legionella pneumophila ○
52	Moraxella catarrhalis ○
53	Mycoplasma pneumoniae ○
54	Neisseria meningitidis ○
55	Proteus mirabilis
56	Pseudomonas aeruginosa ○
57	Serratia marcescens
58	Staphylococcus aureus ○

59	Staphilococcus epidermidis ○
60	Streptococcus group A
61	Streptococcus group B
62	Streptococcus group C
63	Streptococcus group G
64	Streptococcus mutans ○
65	Streptococcus pneumoniae ○
66	Corynebacterium diphtheriae

交叉試験用菌液の試験方法の検討

交叉試験用菌液を前処理することにより、細菌が溶解し、感染力が失活することを確認する必要がある。SmartAmp法を実施する際に、作業者への感染リスクを無くす上で重要である。寒天培地にそれぞれの菌を（マイコプラズマを除く）一定期間培養し、菌が十分増殖した時に寒天培地をかきとって直接菌液を準備した。マイコプラズマは、液体培養後、遠心して上清を取り除き沈渣に生理食塩水を加えて準備した。



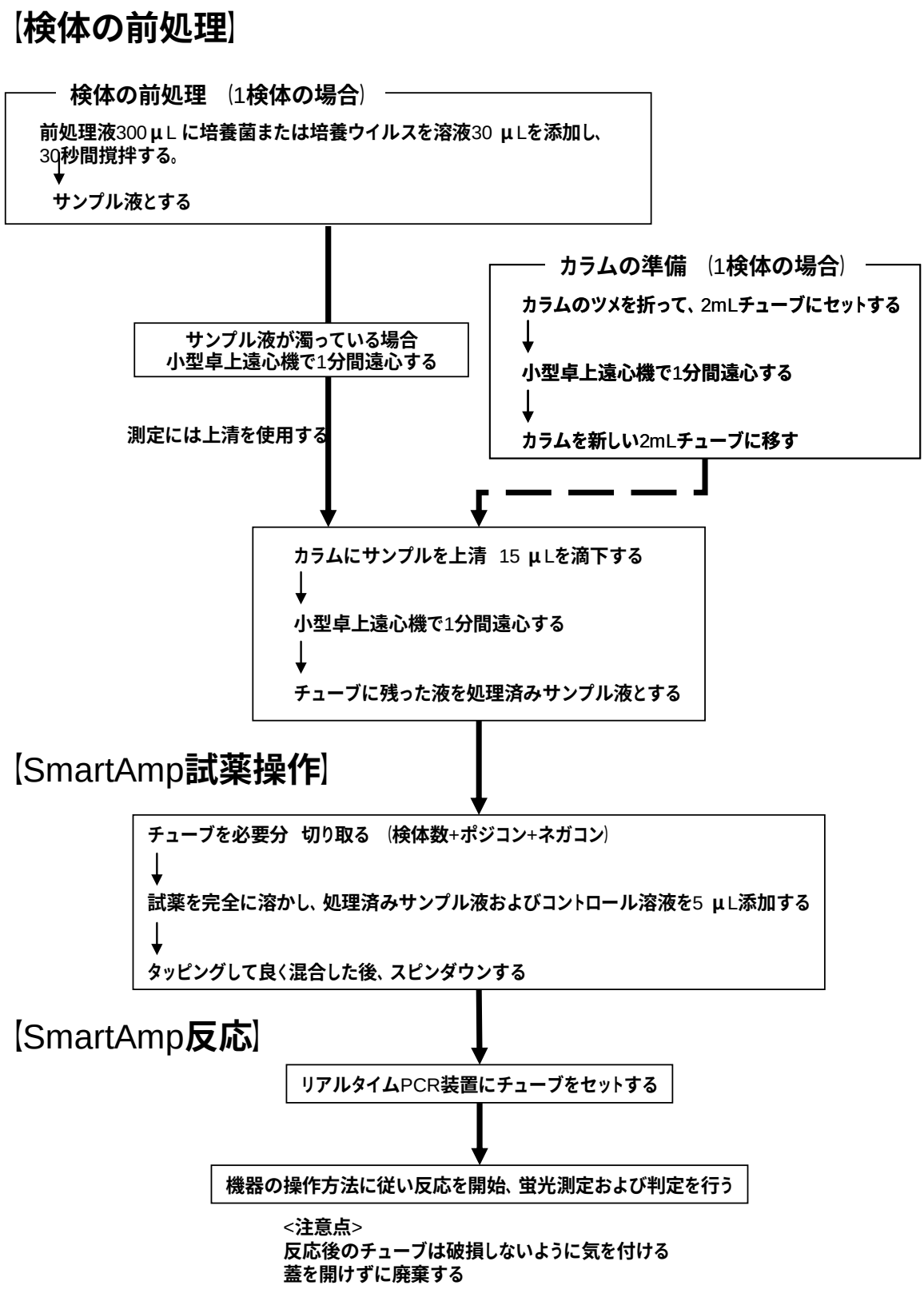
試験用菌液 30 µL を SmartAmp 前処理液 300 µL に加え、良く撹拌した。3, 5, 15 分後に、その液の一部をとって寒天平板に塗抹し、培養を開始した。１週間後に生菌の有無を確認し（n=1）、前処理の時間と細菌の生存率との関係を求めた。前処理によって生菌率がゼロになることを確認した。しかしながら、この処理(15 分)によっても細菌が生存する場合、その菌サンプルを SmartAmp 反応から除外した。これに該当した細菌は次の３種類であった。

#48 Escherichia coli; #50 Klebsiella pneumoniae; #57 Serratia marcescens

これら 3 種類の細菌サンプルを除いて、試験用菌液 30 µL と SmartAmp 前処理液 300 µL を混ぜて試験溶液を準備した。SmartAmp 法の手順では、前処理液をカラムにかけて、その溶出液で SmartAmp 反応を行うので、カラムの目詰まりを防ぐため前処理操作で生じた沈殿（主に細胞壁残骸）を前もって低速遠心で除去した。

交叉試験のデザイン

培養菌または培養ウイルスを用いた交叉試験の手順を以下のフローチャートに示す。



交叉試験の結果（神奈川県衛生研究所）

神奈川県衛生研究所・微生物研究部との共同研究において、新型インフルエンザウイルス A/H1N1 を検出する SmartAmp 法プライマーの特異性を検証するために、44 種類の呼吸器感染性ウイルスおよび 22 種類の細菌株を用いて交叉反応試験を 2010 年 1 月 27-28 日に実施した。その結果、新型インフルエンザウイルス A/H1N1 を検出する SmartAmp 法プライマーは、試験した 3 つの Lot 全てにおいて、2009 pandemic A/H1N1 に対して特異性が高く、且つ他のウイルスおよび細菌株（#48 Escherichia coli; #50 Klebsiella pneumoniae; #57 Serratia marcescens を除く）とは交叉反応がなかった。

新型および季節性ウイルスとの交叉試験の結果（横浜市衛生研究所）

横浜市衛生研究所が保管している新型 A/H1N1、季節性 A/H1N1、季節性 A/H3N2、季節性 B (Victoria)を使って、SmartAmp 法プライマーの特異性を検証した。これらのウイルスのサンプルは横浜市衛生研究所で作製・保管されたもので、10^7 pfu/ml 以上の感染力を持っていた。新型 2009 pandemic A/H1N1 ウイルス株の検出では、そのサンプルを 10^3, 10^4, 10^5 倍希釈したものを前処理カラムに通して、SmartAmp 反応に使用した。季節性 A/H1N1、季節性 A/H3N2、季節性 B (Victoria) に関してはサンプルを希釈せず、そのまま前処理カラムに通して、SmartAmp 反応に使用した。図 12 が示すように、SmartAmp プライマーは新型 2009 pandemic A/H1N1 ウイルスに特異的で、季節性 A/H1N1、季節性 A/H3N2、季節性 B (Victoria)には交叉反応しなかった。

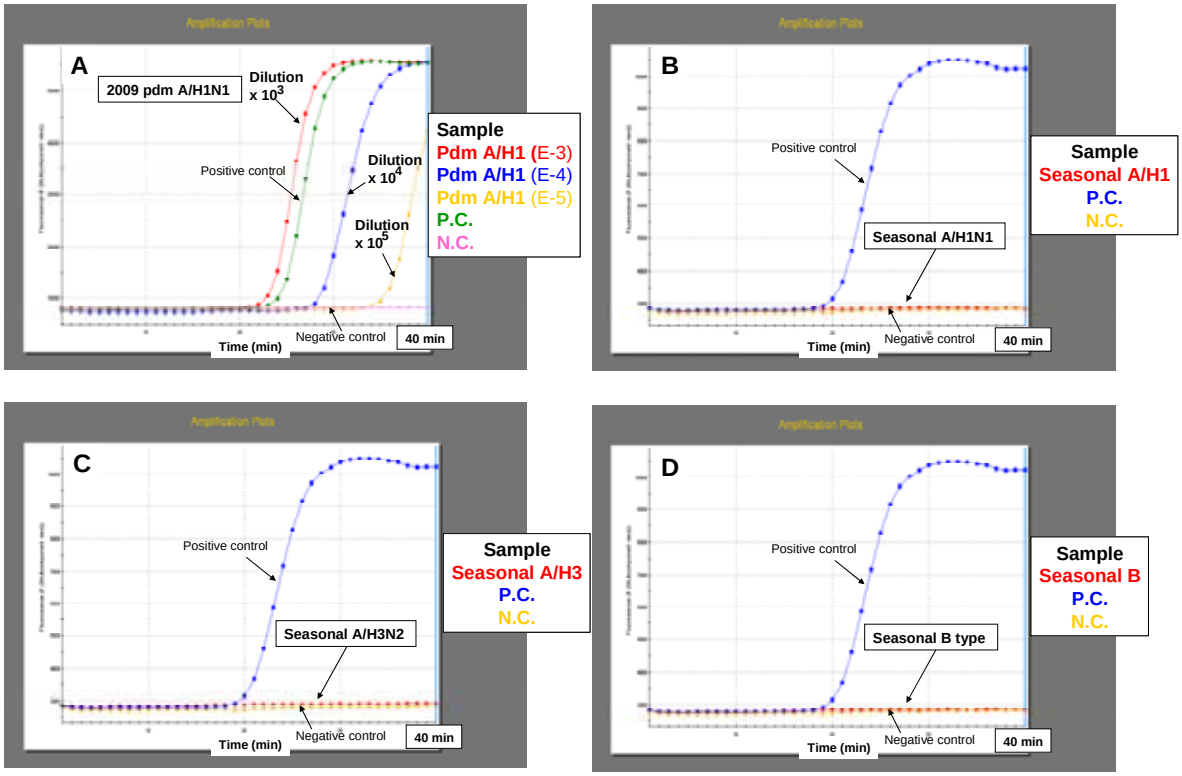


図 12 新型 2009 pdm H1N1、季節性 H1N1、季節性 H3N2、季節性 B のインフルエンザウイルス株を用いた交叉試験

2-8. 臨床検体の受け入れ安全体制の強化

理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域においては、医療機関や病院から搬送されてくる臨床検体を用いて、SmartAmp 法でインフルエンザウイルスを検出する研究を実施するために、横浜研究所研究倫理委員会に研究計画書「SmartAmp 法及び塩基配列決定によるインフルエンザウイルス同定システムの開発」（横浜 H21-12）を提出し、審査の上 2009 年 7 月 31 日に承認を受けた。

さらに、インフルエンザウイルスの感染リスクをなくし、研究者が安全に検体を用いた研究ができるように生物学的安全レベル 2（BSL-2）施設の安全性確保と管理体制を強化した。具体的には、BSL-2 施設に新たに前室を設置し、前室から検体を搬入できるように搬入用パスボックスを設けた(図 13)。研究実施者は前室で防護服・マスク・フェイスガードを着用し、BSL-2 実験室に入るようにした。さらに実験室内には安全キャビネット、クリーンユニット、オートクレーブを設置し、ヘパフィルターを通して外部に廃気する設備を整えた。臨床検体は、BSL-2 実験室の施錠のできる-80℃冷凍庫（長期間保存の場合）で保管した。

検体を理化学研究所に搬送する際は、３層構造をもつウイルス検体搬送用容器（バイオセーフティーパック DSP150®）を用いて、搬送専門業者により検体搬送を行った。検体の搬入、使用、破棄については、理研・検体管理者が管理するログブックにその都度記入することを義務づけた。臨床検体を用いる SmartAmp 研究実施者は理化学研究所オミックス基盤研究領域　西棟 W-315 (BSL-2)実験室利用マニュアル(2009 年 7 月 28 日版)に従うものとした。

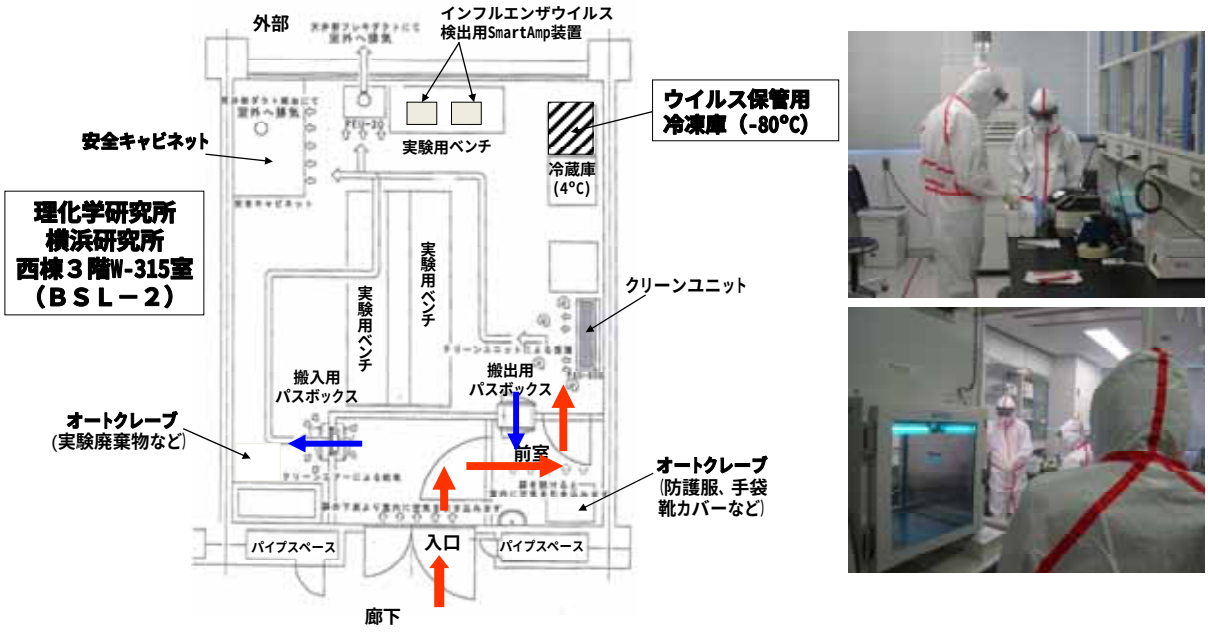


図 13 臨床検体の受け入れ・保管および RNA 抽出のために安全性を向上させた BSL-2 実験室

＊バイオセーフティーパック DSP150®

感染性物質や菌体の輸送用に開発された容器で、吸収剤、エアーキャップ、エアーキャップバッグ、緩衝材、緩衝板、95kPa 耐圧二次容器、外装容器からなる。この搬送容器は空路、陸路、航路における輸送を目的とした規定（国立感染症研究所「新型インフルエンザウイルス検査対応指針と検体搬送のガイドライン」）を全て満たす。

2-9. 新型インフルエンザウイルスを含む臨床研究検体を用いた検証

大阪府立公衆衛生研究所から搬送された臨床検体（匿名化済 91 検体）のうち 20 検体を用いて、新型インフルエンザウイルスのシークエンス解析、SmartAmp 法による検出、ウイルス感染活性の測定を実施し、その結果を比較した（表２）。国立感染症研究所の「新型インフルエンザウイルス検査対応指針と検体搬送のガイドライン（2009 年 5 月 3 日　暫定版)」を遵守し、その臨床検体は東京大学医科学研究所・河岡研究室の BSL-3（生物学的安全レベル３）で保管した。新型インフルエンザウイルスの取り扱いが BSL-2 施設で実施できる厚生労働省令の施行と東京大学医科学研究所の倫理委員会の承認が下りたのを確認した後、臨床検体が理化学研究所オミックス基盤研究領域に分与された。臨床研究検体を用いた SmartAmp 法による検出およびインフルエンザウイルスのゲノムシークエンス解析を実施するにあたり、横浜研究所研究倫理委員会に研究計画書「SmartAmp 法及び塩基配列決定によるインフルエンザウイルス同定システムの開発」を提出し、同研究所倫理委員会の承認を得た（2009 年 7 月 31 日承認)。

理化学研究所オミックス基盤研究領域の「シークエンスに関する手順書」第１版に従って、搬送されてきた検体からインフルエンザウイルスのゲノム RNA を抽出・精製して、逆転写(RT)-PCR 等を行った後、塩基配列を解析した（解析方法は 2-10 を参照)。また抽出した RNA を用いて SmartAmp 法で新型インフルエンザウイルスを検出した。

表２　大阪府立公衆衛生研究所から送られた臨床検体における新型インフルエンザウイルスのシークエンス解析、SmartAmp 法による検出、ウイルス感染活性の測定

	NA (2)	NA (1)	HA (2 & 3)	HA	
検体番号	275(His)	136(Gln)	Sequence analysis	SmartAmp	log(TCID50/ml)
1249	WT	WT	OK	+	4.5
1250	WT	WT	OK	-	3.5
1251	WT	WT	OK	+-	3.75
1252	WT	WT	ND	+-	2.75
1253	WT	WT	OK	+-	3.5
1254	WT	WT	ND	-	2
1256	WT	WT	OK	-	2.75
1257	WT	WT	OK	-	5
1258	WT	ND	ND	-	2.5
1259	WT	WT	OK	-	<
1260	WT	WT	OK	+	4.5
1261	WT	WT	OK	+	3.75
1269	WT	WT	OK	+-	1.75
1274	ND	ND	ND	-	<
1275	WT	WT	OK	+	3.75
1276	ND	ND	ND	-	1.75
1277	ND	ND	ND	+-	2
1278	ND	ND	ND	-	<
1279	ND	ND	ND	-	1.5
1282	WT	WT	OK	+-	2

275(His); タミフル感受性; 136(Gln), リレンザ感受性; WT, 野生型; ND, 測定不可; OK, 測定可能

表２は、大阪府立公衆衛生研究所から送られた 20 検体における新型インフルエンザウイルスのシークエンス解析、SmartAmp 法による検出、ウイルス感染活性の測定の結果を示す。東京大学医科学研究所・河岡研究室がウイルスの感染活性（TCID50 値）を測定した一方、理化学研究所が新型インフルエンザウイルスのシークエンス解析と SmartAmp 法による検出を実施した。感染活性を反映する TCID50 の log 値は、1.75～5.0 と広範な値をしめし、感染力に関して検体間で 1000 倍以上の大きな開きが観測された。20 検体中 12 検体において、シークエンス解析によって新型インフルエンザの HA 分節を確認することができた。一方、SmartAmp 法では 20 検体中 10 検体を検出することができた。概して TCID50 の log 値が 2 乃至 3 以上の場合、新型インフルエンザウイルスを SmartAmp 法で検出する事ができると考えられる。ただし、検体番号 1250 と 1257 では、TCID50 の log 値がそれぞれ 3.5 と 5 にも関わらず、SmartAmp 法で検出できなかった。その原因は不明であり、さらに検証する必要がある。

東京大学医科学研究所・河岡研究室が行った簡易迅速検査キット（免疫クロマト）の検出感度試験では、簡易迅速検査キット間に 100 倍近くの検出感度の差が認められた（「臨床現場でのパンデミック H1N1 2009 の早期診断等の体制構築に関する緊急研究」第 3 回報告会：2010 年 3 月 9 日、国立感染症研究所）。簡易迅速検査キット（免疫クロマト）の検出感度を反映する TCID50 の log 値は４～６であった。よって、SmartAmp 法で検出感度は、簡易迅速検査キット（免疫クロマト）の検出感度の２オーダー以上高い事が判明した。尚、NA 分節のシークエンス解析によって、解析した 20 検体において、野生型である His275 と Gln136 が確認されて、新型インフルエンザはタミフルおよびリレンザに対して感受性であると判断された。

2-10. インフルエンザウイルスのシークエンス解析

大阪府立公衆衛生研究所から送られた 91 検体を用いて、インフルエンザウイルスのシークエンス解析を行った。理化学研究所オミックス基盤研究領域の「シークエンスに関する手順書」第１版に従って、搬送されてきた検体からインフルエンザウイルスのゲノム RNA を抽出して、逆転写(RT)-PCR、分節特異的 PCR を行った後、塩基配列を解析した。

インフルエンザウイルスのゲノムは１本鎖 RNA であることから、まず逆転写 (RT) 反応によって RNA から相補的 DNA (cDNA)を生成した。A 型インフルエンザウイルスの RNA ゲノムは 8 分節(HA, NA, PA, PB1, PB2, M, NP, NS)からなり、それぞれの分節は 5’-および 3’-末端に共通シークエンスを持つ。その性質に基づいて、5’-ACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG-3’ および 5’-ACGCGTGATCAGTAGAAAGG-3’のプライマーを用いてマルチセグメント RT-PCR を行った（文献 10)。ターゲットフラグメントの有無を確認するために、RT-PCR 産物のサイズを 1.5%アガロースゲル電気泳動法によって確認した「シークエンスに関する手順書」第１版に従って、実験を行った。UV 照射しながらルミノ・イメージアナライザーを用いて電気泳動法結果を撮影し、電子ファイルと紙媒体に記録した (図 14)。

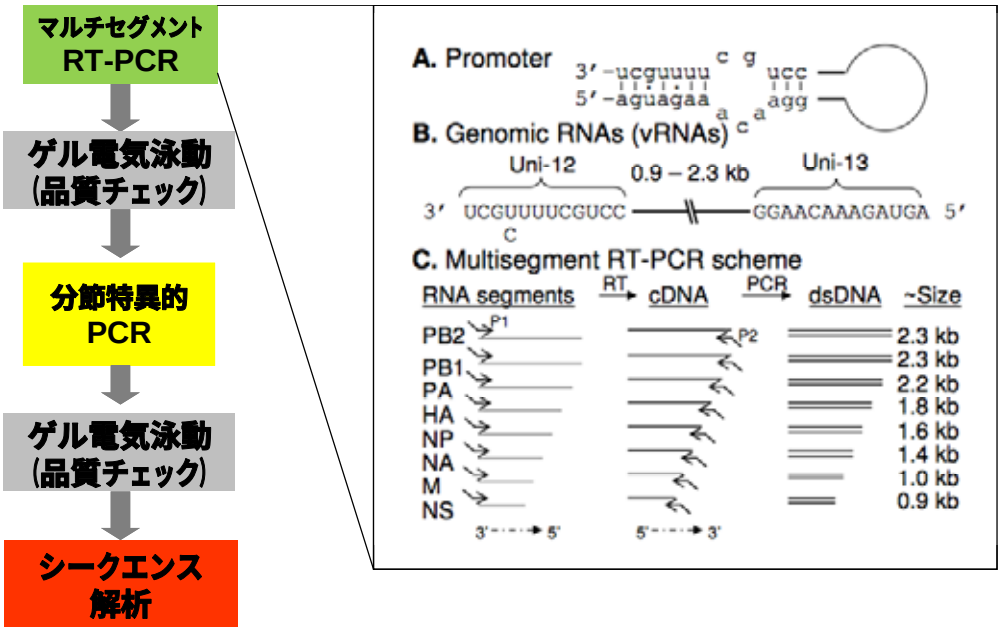


図 14　インフルエンザウイルスのシークエンス解析の手順

＜分節特異的 PCR＞

HA 分節と NA 分節を数個のフラグメントに分けて PCR で増幅した（表 13、図 15 を参照)。その際プライマーの 5’端には T7 または SP6 プロモーター配列をつけておいた（表 3 を参照)。ターゲットフラグメントの有無を確認するために、PCR 産物のサイズを 1.5%アガロースゲル電気泳動法によって確認した。

＜シークエンシング反応と塩基配列測定＞

濃度調製済み PCR 産物を、シークエンシング反応にかけた。シークエンシング反応後の溶液を MultiScreen-HTS HV でゲル濾過精製した。そうして精製できたサンプル(15 μL)を ABI 3730 xl にかけてシークエンス解析した。当該研究においては、A 型インフルエンザウイルス RNA ゲノムの 8 分節のうち、HA 分節と NA 分節の解析を優先的に行った。その理由は、SmartAmp 法で HA 分節を検出する一方、NA 分節の変異はタミフル耐性またはリレンザ耐性に関係するためである。

表３　分節特異的 PCR のプライマー塩基配列

分節	PCR部位	プライマー名	プライマー塩基配列 (5'→3')
PB2	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6PB2r1	atttaggtgacactatagaaGCCAGCTGTGACTCTGATGT
	2	T7PB2f2	taatacgactcactatagggTAAGGAGGAGAGTTGATACA
	2	SP6PB2r2	atttaggtgacactatagaaTGTGCTGTGGCACATTTCCA
	3	T7PB2f3	taatacgactcactatagggGGAGAAGTGAGAAATGATGA
	3	SP6PB2r3	atttaggtgacactatagaaATGGATTCAATTCCCCAGTT
	4	T7PB2f4	taatacgactcactatagggTAGGGGCGATCTGAACTTTG
	4	SP6PB2r4	atttaggtgacactatagaaTGCCTTAGGGACAAGAGACT
	5	T7PB2f5	taatacgactcactatagggAACACTTATCAATGGATAAT
	5	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
PB1	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6PB1r1	atttaggtgacactatagaaATTAGCTGTTAGGCCATTCG
	2	T7PB1f2	taatacgactcactatagggACAAACAAGGGTAGATAAAC
	2	SP6PB1r2	atttaggtgacactatagaaTGCTCCTAGCTAAAGTTTCA
	3	T7PB1f3	taatacgactcactatagggATAAGAGCACTGACATTAAA
	3	SP6PB1r3	atttaggtgacactatagaaTTGTCCAAGATTCAGTATCG
	4	T7PB1f4	taatacgactcactatagggATTGAGAAAATAAGGCCTCT
	4	SP6PB1r4	atttaggtgacactatagaaTGTGTATCTGTAGTCTTTGA
	5	T7PB1f5	taatacgactcactatagggACATGAGTATTGGAGTAACA
	5	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
PA	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6PAr1	atttaggtgacactatagaaAAAGGAATCCCATAGACTCC
	2	T7PAf2	taatacgactcactatagggTGGCCACCAAAGCGGACTAC
	2	SP6PAr2	atttaggtgacactatagaaGGTCTTCAATACTTAATTTC
	3	T7PAf3	taatacgactcactatagggGAAGTGAACGCCAAAATTGA
	3	SP6PAr3	atttaggtgacactatagaaCTTCATTATGTATTCAGTAG
	4	T7PAf4	taatacgactcactatagggTGATTCAAGCTGGATAGAAC
	4	SP6PAr4	atttaggtgacactatagaaTGCTCTCAATCTGCTGAAGA
	5	T7PAf5	taatacgactcactatagggGCCAAGTGTCGAGGCCCATG
	5	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
HA	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6HAr1	atttaggtgacactatagaaTGTTCGAGTCATGATTGGGC
	2	T7HAf2	taatacgactcactatagggGATTATGAGGAGCTAAGAGA
	2	SP6HAr2	atttaggtgacactatagaaGATCCAGCATTTCTTTCCAT
	3	T7HAf3	taatacgactcactatagggACTGGACACTAGTAGAGCCG
	3	SP6HAr3	atttaggtgacactatagaaCTCTTTACCTACTGCTGTGA
	4	T7HAf4	taatacgactcactatagggCGACCTGAAGAGCACACAGA
	4	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
NP	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6NPr1	atttaggtgacactatagaaTTCACCGCAGCACCTGCGGC
	2	T7NPf2	taatacgactcactatagggTGATGCCACATATCAGAGAA
	2	SP6NPr2	atttaggtgacactatagaaGGAATCACTTTCTTTCCTCT
	3	T7NPf3	taatacgactcactatagggAAGTGGTCAGCCTGATGAGA
	3	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
NA	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6NAr1	atttaggtgacactatagaaATTAGGGTTCGATATGGGCT
	2	T7NAf2	taatacgactcactatagggCCTTGGAATGCAGAACCTTC
	2	SP6NAr2	atttaggtgacactatagaaGATTGTCTCCGAAAATCCCA
	3	T7NAf3	taatacgactcactatagggAAAGGGAAAGATAGTCAAAT
	3	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
M	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6MPr1	atttaggtgacactatagaaTCAGCAATCTGTTCACAAGT
	2	T7MPf2	taatacgactcactatagggCACTTGCCAGTTGCATGGGC
	2	SP6MPr2.	atttaggtgacactatagaaCGAGAGGATCACTTGAATCG
	3	T7MPf3	taatacgactcactatagggCTAGCTCCAGTGCTGGTCTG
	3	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
NS	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6NSr1	atttaggtgacactatagaaAACTATTGCTCCCTCCTCAG
	2	T7NSf2	taatacgactcactatagggCGATTGGACCAGGCGATCAT
	2	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG

小文字は T7 および SP6 プロモーターのシークエンスを示す。

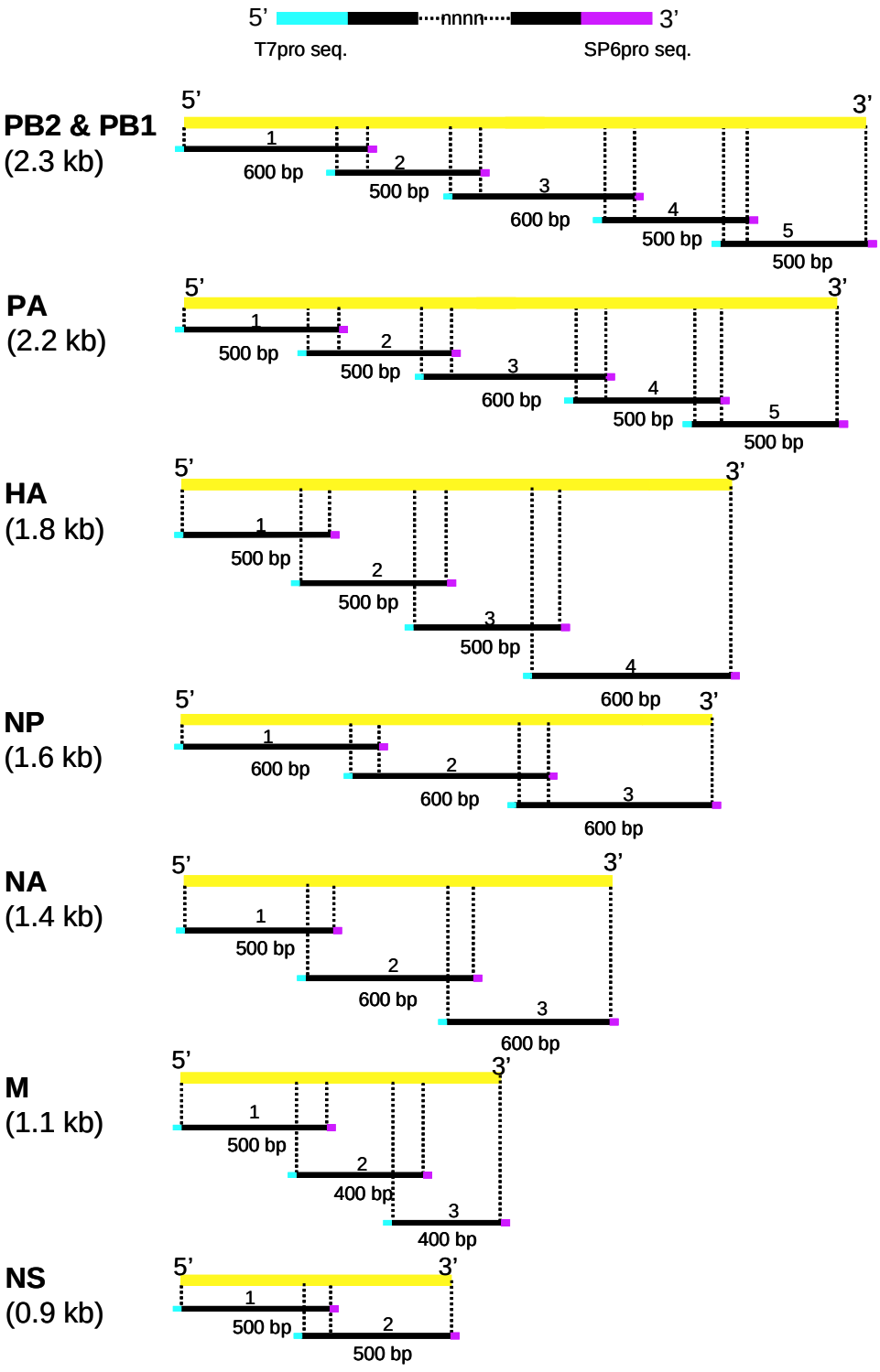


図 15 分節特異的 PCR の増幅範囲

表 4 大阪府立公衆衛生研究所から搬送された 91 検体のシークエンス解析結果

		NA (fragment2)	NA (fragment1)	HA (fragments2&3)
検体番号	RT-PCR 判定	275(His)	136(Gln)	Sequence analysis
1249	2009 pdm	WT	WT	OK
1250	2009 pdm	WT	WT	OK
1251	2009 pdm	WT	WT	OK
1252	2009 pdm	WT	WT	ND
1253	2009 pdm	WT	WT	OK
1254	2009 pdm	WT	WT	ND
1256	2009 pdm	WT	WT	OK
1257	2009 pdm	WT	WT	OK
1258	2009 pdm	WT	ND	ND
1259	2009 pdm	WT	WT	OK
1260	2009 pdm	WT	WT	OK
1261	2009 pdm	WT	WT	OK
1269	2009 pdm	WT	WT	OK
1274	2009 pdm	ND	ND	ND
1275	2009 pdm	WT	WT	OK
1276	2009 pdm	ND	ND	ND
1277	2009 pdm	ND	ND	ND
1278	2009 pdm	ND	ND	ND
1279	2009 pdm	ND	ND	ND
1282	2009 pdm	WT	WT	OK
1289	2009 pdm	WT	WT	OK
1290	2009 pdm	WT	WT	OK
1297	2009 pdm	WT	WT	OK
1300	2009 pdm	WT	WT	ND
1301	2009 pdm	ND	ND	OK
1302	2009 pdm	WT	ND	OK
1304	2009 pdm	WT	WT	OK
1308	2009 pdm	WT	WT	OK
1314	2009 pdm	ND	ND	ND
1315	2009 pdm	WT	ND	OK
1322	2009 pdm	WT	WT	OK
1324	2009 pdm	WT	WT	OK

1329	2009 pdm	WT	WT	OK
1330	2009 pdm	ND	ND	ND
1331	2009 pdm	ND	ND	ND
1333	2009 pdm	ND	WT	OK
1336	2009 pdm	WT	WT	OK
1342	2009 pdm	ND	WT	OK
1344	2009 pdm	WT	WT	OK
1346	2009 pdm	WT	ND	OK
1349	2009 pdm	WT	ND	OK
1356	2009 pdm	WT	WT	OK
1360	2009 pdm	ND	ND	ND
1361	2009 pdm	ND	ND	ND
1364	2009 pdm	WT	WT	OK
1365	2009 pdm	WT	ND	ND
1366	2009 pdm	WT	ND	ND
1367	2009 pdm	WT	WT	OK
1368	2009 pdm	WT	ND	OK
1369	2009 pdm	WT	WT	OK
1370	2009 pdm	ND	ND	OK
1371	2009 pdm	WT	WT	OK
1373	2009 pdm	WT	ND	OK
1374	2009 pdm	WT	WT	OK
1376	2009 pdm	WT	WT	OK
1377	2009 pdm	WT	WT	OK
1380	2009 pdm	ND	ND	ND
1383	2009 pdm	WT	WT	OK
1388	2009 pdm	ND	ND	ND
1390	2009 pdm	WT	WT	OK
1391	2009 pdm	ND	ND	ND
1392	2009 pdm	ND	WT	OK
1393	2009 pdm	ND	ND	OK
1394	2009 pdm	WT	ND	ND
1396	2009 pdm	ND	ND	ND
1399	2009 pdm	ND	ND	ND

275(His); タミフル感受性; 136(Gln), リレンザ感受性; WT, 野生型; ND, 測定不可; OK, 測定可能

1400	2009 pdm	ND	ND	OK
1404	2009 pdm	WT	ND	ND
1405	2009 pdm	WT	WT	ND
1406	2009 pdm	WT	WT	OK
1407	2009 pdm	WT	WT	OK
1413	2009 pdm	ND	ND	ND
1427	2009 pdm	ND	ND	OK
1429	2009 pdm	WT	WT	ND
1430	2009 pdm	WT	WT	OK
1432	2009 pdm	WT	WT	OK
1433	2009 pdm	WT	WT	OK
1434	2009 pdm	WT	WT	ND
1435	2009 pdm	WT	WT	OK
1437	2009 pdm	WT	WT	OK
1446	2009 pdm	WT	WT	ND
1447	2009 pdm	WT	WT	ND
1448	2009 pdm	WT	WT	OK
1456	2009 pdm	WT	WT	OK
1458	2009 pdm	ND	ND	ND
1459	2009 pdm	WT	WT	ND
1476	2009 pdm	WT	WT	OK
1478	2009 pdm	WT	ND	OK
1480	2009 pdm	WT	WT	OK
1482	2009 pdm	WT	ND	ND
1490	2009 pdm	WT	WT	ND

275(His); タミフル感受性; 136(Gln), リレンザ感受性; WT, 野生型; ND, 測定不可; OK, 測定可能

＜シークエンス解析の結果＞

大阪府立公衆衛生研究所から送られた 91 検体のシークエンス解析結果を図４に示す。RT-PCR 判定で、全ての検体は新型インフルエンザウイルス(2009 pandemic A/H1N1)であると確定診断されていたが、シークエンス解析ができたのはその約 75%であった。25%近くの検体がシークエンス解析できなかった理由は、マルチセグメント RT-PCR の効率が十分高くなかった事が原因である。シークエンス解析ができた検体に関して、NA 分節の Gln136 と His275 をコードする塩基配列には変異が見つからなかった。

2-11. インフルエンザウイルスの変異解析

大阪府立公衆衛生研究所から搬送された 91 検体に加えて、臨床研究(2-10)で採取された 393 検体、合計 484 検体からウイルスゲノム RNA を抽出し、シークエンス解析を行った。その結果、多様な変異が見つかり、それらを Neighbor-Joining 法で解析して系統樹としてまとめた(図 16)。

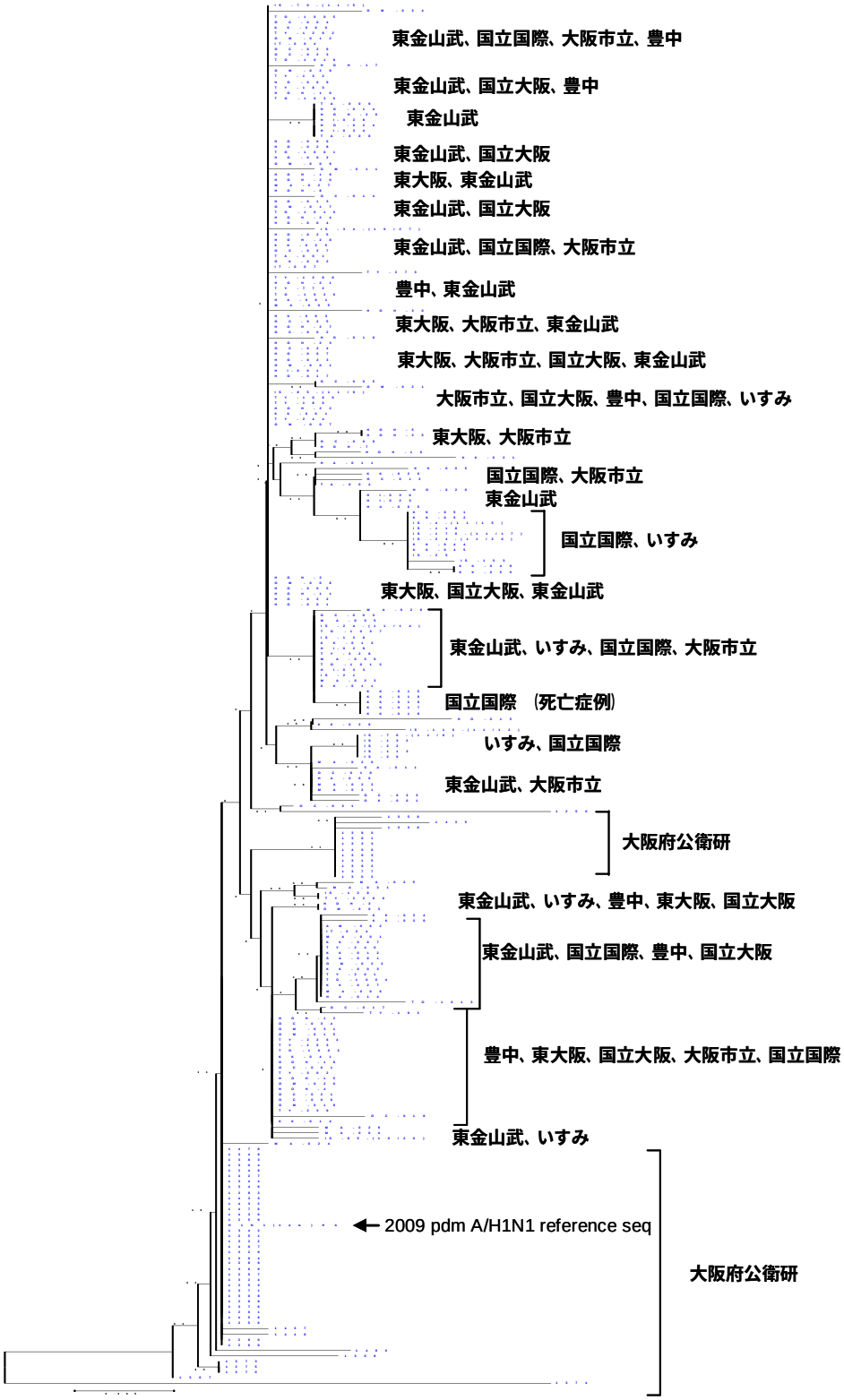


図 16 新型インフルエンザウイルスの変異解析

大阪府立公衆衛生研究所の検体は 2009 年 5 月 16～20 日に６地域の管轄保険所で採取されたものであり、他の医療機関の検体はそれよりも約半年後（2009 年 10 月～2010 年１月）に採取された。新型インフルエンザウイルスの変異に基づく系統樹 (図 16)において、大阪府立公衆衛生研究所の検体の大多数では、当初発表された新型インフルエンザウイルスのシークエンスと同じであり、同一のグループに属する。一方、他の医療機関の検体では、ウイルスの変異が多様に起きたことにより、グループが分散している。このことは、2009 年５月以降、新型インフルエンザウイルスの変異が頻繁に起きた事を示唆する。

表５は臨床研究に参画した医療機関のリストを示す。本臨床研究は東京・千葉地区と大阪地区で実施したので、関東圏と関西圏の検体を使ってシークエンス解析をすることができた。図 16 において、一部に地域特異的な変異が認められるが、関東圏と関西圏の検体がグループ内に混在している。このことは、交通機関の発達により我が国における人の移動が頻繁であり、変異したインフルエンザウイルスが一つの地域に留まらず、速やかに伝播して行ったと考えられる。
尚、図 16 は拡大率を 500%にすることにより検体番号を読み取ることができる。以下に医療機関番号を記述する。

<u>東京・千葉地区</u>
国立国際医療研究センター **(KK)**
いすみ医療センター **(IS)**
千葉県立東金病院 **(TO)** と山武郡市の診療所
天野内科クリニック（東金市）(AM)
伊藤医院（山武市）(IT)
岡崎医院（東金市）(OK)
松尾クリニック（山武市）(MA)
山武市日向診療所（山武市）(HI)
佐久間医院（大網白里町）(SA)
北辰堂佐藤医院（東金市）(HO)
高橋医院（九十九里町）(TA)
西田医院（東金市）(NI)
はにや内科（大網白里町）(HA)
古川クリニック（九十九里町）(HU)

<u>大阪地区</u>
国立病院機構大阪医療センター**(OM)**
市立豊中病院 **(TY)**
東大阪市立総合病院 **(HOH)**
大阪市立総合医療センター **(OC)**

表5　臨床研究に参画した医療機関のリスト

関東圏（千葉・東京）　　関西圏（大阪）

病院名	千葉県立東金病院	いすみ医療センター	国立国際医療センター	市立豊中病院	国立病院機構大阪医療センター	東大阪市立総合病院	大阪市立総合医療センター
実施機関研究責任者	院長	院長	国際疾病センター長	腎臓内科部長	総合診療部長　腎臓内科科長	循環器科部長	
	平井　愛山	姫野　雄司	工藤　宏一郎	福永　惠	和田　晃	木島　祥行	塩見　正司
実施機関研究担当者	感染症内科	副院長	特別疾病征圧班班長		臨床研究センター　臨床研究推進室 治験管理部門　治験主任	治験管理室主査	治験管理室
	林　栄治	伴　俊明	泉　信有		坂本　泰一	野村　剛久	井上　薫
	臨床検査科長	臨床検査科長			臨床検査診断部長　研究検査科科長	院長	治験管理室
	鶴岡　成一	齊藤　美朝			眞能　正幸	波多　丈	室谷　有利子
					臨床疫学研究室部長		
	石井　勝弘				是恒　之宏		
	地域連携課			副院長	臨床研究センター　臨床研究推進室 治験管理部門　治験コーディネーター		
	外口　徳美致			片桐　修一	森下　典子		
事務局担当者	事務局長	事務局長					
	今関	伊大和幸俊					
検体数	161	35	63	38	34	30	32
住所	〒283-8588 千葉県東金市台方1229	〒298-0123 千葉県いすみ市苅谷1177	〒162-8655 東京都新宿区戸山1-21-1	〒560-8565 豊中市紫原町4-14-1	〒540-0006 大阪市中央区法円坂2-1-14	〒578-8588 東大阪市西岩田3-4-5	〒534-0021 大阪市都島区都島本通2-13-22

2-12. 臨床研究

新型インフルエンザウイルス（2009 pdm A/H1N1）を迅速且つ高感度で検出する体外診断法の開発を目標として、SmartAmp 法の実用性を臨床現場で検証する自主臨床研究を、国立国際医療研究センター、千葉県立東金病院、いすみ医療センター、国立病院機構大阪医療センター、大阪市立総合医療センター、市立豊中病院、東大阪市立総合病院の７か所で 2009 年 10 月から 2010 年 1 月までの期間で実施した。具体的には、インフルエンザ患者の Swab サンプル（鼻腔ぬぐい液検体）等を用いて、新型インフルエンザ A/H1N1 ウイルスを SmartAmp 法によって検出した。

国立国際医療研究センター、千葉県立東金病院、いすみ医療センターでは、患者１人につき２本の Swab 検体を採取し、それぞれ免疫クロマト法と SmartAmp 法でインフルエンザウイルスの検出を行った。理化学研究所ではシークエンス解析を行った。

一方、国立病院機構大阪医療センター、大阪市立総合医療センター、市立豊中病院、東大阪市立総合病院では、患者１人につき Swab 検体１本のみを採取し、免疫クロマト法で検査した。残りの鼻腔ぬぐい液検体を凍結して、理化学研究所に搬送し、理化学研究所内で SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルスの検出とシークエンス解析を実施した。
豊能広域こども急病センターでの臨床研究は当初計画されていたが、上述の期間中インフルエンザ患者（小児）が多すぎて、診療・治療の限界となり、臨床研究を実施できなかった。

本臨床研究の計画書は、臨床研究を実施した医療機関の倫理委員会で審査され承認された。文部科学省、厚生労働省および経済産業省において共同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」と厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年 7 月 31 日改正）」および「ヘルシンキ宣言（2008 年改訂）」を遵守し、当該臨床研究に参加する患者の同意の下で実施した。患者が未成年の場合には親の同意を得た。さらに、国立感染症研究所の「新型インフルエンザウイルス検査対応指針と検体搬送のガイドライン（2009 年 5 月 3 日　暫定版）」を遵守して検体の搬送を実施した。本臨床研究で採取された検体を用いて、シークエンス解析および SmartAmp 法と RT-PCR 法によるインフルエンザウイルスを検出するにあたって、臨床研究計画書(H21-12(2))を理化学研究所の研究倫理委員会に提出し(2009 年 10 月 5 日)、10 月 27 日開催の委員会で審議の上承認された(2009 年 11 月 9 日)。また、2-7 で記述したように、理化学研究所に搬送された検体は BSL-2 実験室(W-315)の中で処理（RNA 抽出）した。

臨床研究責任者、臨床研究担当医師および研究協力者が本研究に係る医療情報および同意書等を取扱う際は、対象患者の秘密保護に十分配慮した。理化学研究所内で取り扱うデータは、臨床研究実施機関が付ける患者整理番号により連結可能匿名化を行なったデータのみとした。臨床データは、おのおのの臨床研究実施医療機関が管理した。以下に臨床研究を実施するにあたってのルールを記述する。

対象症例の選択

対象患者

発熱がありインフルエンザ感染が疑われる患者

選択基準

下記①②の条件を満たす被検者

①インフルエンザ様症状を呈した患者

＊インフルエンザ様症状とは以下の 1)かつ 2)を満たすもの

1) 37.5℃以上の発熱

受診時に限定するものではなく、経過中の最高体温が 37.5℃以上

2) 急性呼吸器症状などの臨床症状

咳、咽頭・喉頭痛、倦怠感、喀痰、鼻汁・鼻閉、頭痛など

② 本人、またはその代諾者から書面にて同意が得られた被検者

収集する臨床データ

収集する臨床データとしては：患者の年齢、性、身体所見（身長、体重）、体温、インフルエンザ様症状（発熱、咳、咽頭痛、倦怠感、喀痰、鼻汁・鼻閉、頭痛、関節痛等）および薬の服用の有無、薬の名称（服用した場合）と服用量などを含む。

妊婦、幼児、高齢者や、慢性呼吸器疾患・慢性心疾患・代謝性疾患（糖尿病等）・腎機能障害・免疫機能不全（ステロイド全身投与等）等を有する者など、治療経過や管理の状況等を勘案して医師により重症化のリスクが高いと判断される被験者は、臨床データに特記する。

研究担当医師および研究協力者が本研究に係る医療情報および同意書等を取り扱う際は、対象患者の秘密保護に十分配慮する。提出するデータは、患者整理番号により連結可能匿名化を行ったデータのみとする。研究結果を公表する際は、対象患者を特定できる情報を含まないようにする。本研究の目的以外に、研究で得られたデータを原則的に使用しない。

患者に対する説明と同意の取得

受診した外来患者で、発熱がありインフルエンザ感染が疑われるものに対して当該臨床研究について臨床研究担当医師または研究協力医師が説明を行い、臨床研究に参加する同意を示す書面（同意書：インフォームドコンセント）を患者から頂く。

披験者の登録と披験者情報の管理

臨床研究実施医療機関の臨床研究担当医師あるいは研究協力者は、対象条件（4. 対象症例の選択）を満たす患者（被験者）を所定の登録用紙に記入し、個人情報管理者に提出する。個人情報管理者は被験者の登録を行い、臨床研究担当者に連結可能匿名化のための割付番号を連絡する。その連絡を受けて、臨床研究担当者は本研究のための swab 処理を開始する。被験者の臨床情報は、臨床研究実施医療機関の臨床研究担当医師あるいは研究協力医師が管理する。

研究デザイン：国立国際医療研究センターにおける臨床研究

本成果報告書には臨床研究の１例として国立国際医療研究センターにおける臨床研究の方法と結果を記述する。またさらに、千葉県立東金病院といすみ医療センターで実施した臨床研究の最終報告書を付録資料１および２として添付する。

本臨床研究においては、患者から採取された鼻腔ぬぐい液検体（連結可能匿名化済みサンプル）を用いて、免疫クロマト法でA型インフルエンザ陽性か陰性かの判定を行った。免疫クロマト法による判定には、市販のキットを用いた。免疫クロマト検査後、残りの鼻腔ぬぐい液検体（市販キット）から約 100 µl を無菌チューブ（理化学研究所から提供）に移し凍結した。その凍結検体を理化学研究所横浜研究所・オミックス基盤研究領域に搬送した。その際、国立感染症研究所の「新型インフルエンザウイルス検査対応指針と検体搬送のガイドライン（2009 年 5 月 3 日　暫定版）」を遵守し、臨床検体搬送業者に委託した。一方、SmartAmp 用綿棒（理研から提供されたキット）を用いて、同一患者から別途鼻腔ぬぐい液（swab 検体）を採取した。国立国際医療研究センターでは、採取した検体に対して前処理を行った後、SmartAmp 法で直接インフルエンザウイルスを検出した (図 17)。この検出によって、新型インフルエンザウイルス陽性・陰性を判定した。

理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域では、国立国際医療研究センターから搬送された鼻腔ぬぐい液検体（免疫クロマト検査で残った約 100 µl の凍結検体および SmartAmp 検出後の残り液の凍結検体）を受理し、融解して RNA 抽出したあと、multi-segment RT-PCR による RNA→cDNA 生成と分節特異的 PCR による DNA 増幅をおこなった。そして PCR で増幅した DNA をシークエンス解析した。それらの結果を、SmartAmp 法によるインフルエンザウイルス検出結果と比較することにより、SmartAmp 法の正確さを検証した (図 17)。

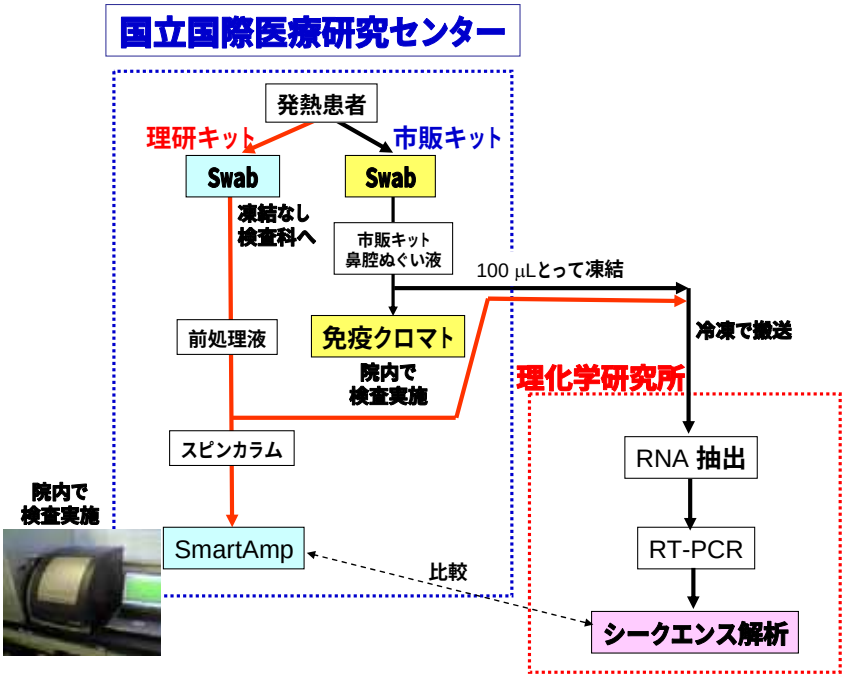


図 17　国立国際医療研究センターにおける検体の採取と検体の処理方法

表6　国立国際医療研究センターにおける臨床研究の結果

国立国際医療研究センター(2009/10/27-20101/06)

検体番号	免疫クロマト	SmartAmp	シークエンス解析	備考
KK-1	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発熱から15時間後に検体採取
KK-2	(-)	(-)	no amplification	21時間前に発熱。来院時解熱傾向。気管支喘息、熱性痙攣の既往
KK-3	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発熱から8時間後に検体採取
KK-4	(-)	(-)	no amplification	21時間前に発熱。来院時解熱傾向。気管支喘息、熱性痙攣の既往
KK-5	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	咳嗽は前日から。発熱から5-6時間後に検体採取。気管支喘息
KK-6	(-)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発熱から6時間後に検体採取
KK-7	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発熱から21時間後に検体採取
KK-8	(-)	(-)	no amplification	発熱から2時間30分後に検体採取。検査実施後、尿路感染症と判明
KK-9	(-)	(-)	no amplification	発熱から2時間20分後に検体採取。
KK-10	(-)	(-)	no amplification	発熱から15時間後に検体採取。
KK-11	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発熱から2時間20分後に検体採取。気管支喘息
KK-12	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	3日前から発熱、昨日までは免疫法陰性
KK-13	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発熱から24時間後に検体採取
KK-14	A(+/-)	(-)	2009 pandemic A/H1N1	4日前から断続的に発熱、同日よりタミフル60mg。免疫法ではごく僅かに線を認める
KK-15	A(+/-)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発熱から11時間後に検体採取。免疫法ではごく僅かに線を認める
KK-16	(-)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	KK-15症例重症化、人工呼吸器管理、鼻腔ぬぐい。発熱から28時間後に検体採取。
KK-17	(-)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	KK-15症例重症化、人工呼吸器管理、気道吸引痰。発熱から28時間後に検体採取
KK-18	(-)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	KK-15症例死亡時、鼻腔ぬぐい。発熱から52時間後に検体採取
KK-19	(-)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	KK-15症例死亡時、気道吸引痰。発熱から52時間後に検体採取
KK-20	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	2日前より発熱ほかの症状。
KK-21	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	2日前より発熱ほかの症状
KK-22	(-)	(-)	no amplification	発熱から48時間後に検体採取。濃厚接触あり
KK-23	(-)	新型(+)	no amplification	4日前から上気道症状
KK-24	(-)	(-)	NA分節を同定	24時間前より発熱
KK-25	(-)	新型(+)	NA分節を同定	10時間前より発熱
KK-26	(-)	(-)	NA分節を同定	14時間前より発熱
KK-27	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	13時間前より発熱。免疫クロマトはうっすらと陽性
KK-28	(-)	(-)	no amplification	24時間前より発熱
KK-29	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	13時間前より発熱。HIV (+)
KK-30	(-)	(-)	no amplification	14時間前より発熱, HIV (+)

KK-31	(-)	(-)	no amplification	7時間前より発熱
KK-32	(-)	(-)	no amplification	30時間前より発熱
KK-33	(-)	(-)	no amplification	急激な高熱 (38.9)と肺炎像
KK-34	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	
KK-35	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	
KK-36	(-)	(-)	no amplification	
KK-37	(-)	(-)	no amplification	
KK-38	(-)	(-)	no amplification	発熱から5日後に検体採取、タミフルday4。濃厚接触あり
KK-39	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	3日前発熱・痙攣で発症、day1-2は免疫ク陰性。
KK-40	(-)	新型(+)	no amplification	3日前発熱・喘鳴で発症、day1-2は免疫ク陰性。
KK-41	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発熱翌日。肺炎像＋喘息発作あり。
KK-42	(-)	(-)	no amplification	5日前にA陽性で治療を受けたが、本日再発熱 (39.5℃)
KK-43	(-)	(-)	no amplification	34時間前に発症. 38.8℃.
KK-44	(-)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発症後2時間！38.5℃. 38minから上昇.
KK-45	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	24時間前に発症.
KK-46	(-)	(-)	no amplification	37.8℃. 上気道症状あり. 発症後24時間
KK-47	(-)	(-)	HA分節を同定	発症後4時間 (熱感・筋肉痛・関節痛) 解熱剤服用後であり36.7℃.
KK-48	(-)	(-)	no amplification	発症後5時間. 37.8℃.
KK-49	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発症後12時間. 38.2℃. 抗癌剤治療中.
KK-50	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	KK-47症例. 発症後11時間.
KK-51	(-)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	喘息児童入院5日目. 36℃. 付添いの母が本日A型で発症(濃厚接触) .
KK-52	A(+)	(-)	2009 pandemic A/H1N1	発症後6.5時間. 39.6℃.
KK-53	(-)	(-)	2009 pandemic A/H1N1	KK-50と同一症例。発症後day7
KK-54	(-)	(-)	no amplification	6時間前に発症. 38.5℃.
KK-55	(-)	(-)	no amplification	6時間前に発症. 38.1℃.
KK-56	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発症4日後. 脳症と重症肺炎で挿管中. (シークエンス解析によりタミフル耐性変異を確認)
KK-57	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	KK-56と同一症例. 検体は気道分泌物. (シークエンス解析によりタミフル耐性変異を確認)
KK-58	(-)	(-)	2009 pandemic A/H1N1	KK-56と同一症例. 発症day9. 挿管中. (シークエンス解析によりタミフル耐性変異を確認)
KK-59	(-)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	KK-56と同一症例. 検体は気道分泌物. (シークエンス解析によりタミフル耐性変異を確認)
KK-60	A(+/-)	(-)	2009 pandemic A/H1N1	発症後day5. 38.3℃.
KK-61	(-)	(-)	no amplification	発症後14時間. 解熱剤で37.0℃.
KK-62	(-)	(-)	no amplification	発症後24時間. 解熱剤で37.5℃.
KK-63	A(+)	新型(+)	2009 pandemic A/H1N1	発症後6時間. 37.9℃.

国立国際医療研究センターにおける臨床研究の結果

2009 年 10 月 20 日から 2010 年 1 月 6 日の期間で、発熱がありインフルエンザ感染が疑われる患者を対象として、臨床研究を実施した。患者から鼻腔ぬぐい液検体（インフォームドコンセントと連結可能匿名化済み）を採取して、合計 63 検体について免疫クロマト法と SmartAmp 法によって新型および季節性インフルエンザウイルスを検出した。そして免疫クロマト法と SmartAmp 法の結果を比較検討した。表６および表７を参照。

免疫クロマトと SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の比較

合計 63 検体のうち、22 検体は免疫クロマト法で A 型インフルエンザ（季節性または新型）「陽性(+)」と判定された。一方、SmartAmp 法では 33 検体が新型 A インフルエンザ「陽性(+)」と判定された。

免疫クロマト法で「陽性(+)」と判定された 22 検体 (21 + 1 検体) のうち 21 検体は、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性(+)」と判定された。のこり 1 検体は、免疫クロマト法で A 型インフルエンザ「陽性(+)」と判定されたにも関わらず、SmartAmp 法では新型インフルエンザ「陰性(-)」と判定された。この１検体に関しては、偽陰性または SmartAmp 用 swab 検体にウイルス量が少なかった可能性があり、RT-PCR で確認する必要がある。

一方、免疫クロマト法検査で A 型インフルエンザ「陰性」となった 41 検体のうち、SmartAmp 法で新型 A インフルエンザ「陽性(+)」となった検体は合計 12 あった。即ち、免疫クロマト法検査で検出できなかった偽陰性が少なくとも 29.3% (12/41)あったことを意味する。

表７　免疫クロマトと SmartAmp 法の比較

免疫クロマト	SmartAmp	検体数
A (+)	新型 (+)	21
A (+)	新型 (-)	1
A (-)	新型 (+)	12
A (-)	新型 (-)	29
合計		63

上述の１２検体のうち、KK-15, KK-16, KK-17, KK-18, KK-19 は同一患者（死亡症例：以下に詳しく記述）から採取されたものである。鼻腔ぬぐい液検体ばかりでなく道吸引痰検体においても、同じ前処理をして SmartAmp 法で新型インフルエンザウイルスを検出できたことは、SmartAmp 法の応用性を拡大するものである。またさらに KK-56 と KK-59 は気道分泌物の検体であるが、SmartAmp 法で新型インフルエンザを検出できた。

そして SmartAmp 法で「陽性(+)」と判断された検体は、KK-23 と KK25 を除いて、全てシークエンス解析で確認する事ができた。

症例１（国立国際医療研究センター）

検体番号：KK-15, KK-16, KK-17, KK-18, KK-19　（死亡症例）

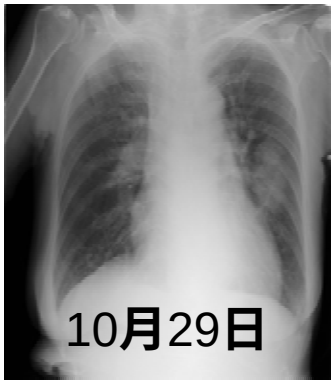
東京在住の72歳の女性患者は自己免疫性肝硬変で、国立国際医療研究センター（消化器科）でステロイド（プレドニゾロン5mg/day）と免疫抑制剤（アザチオプリン50mg/day）の治療を受けていた。肝硬変の状況は末期であり肝性脳症や食道静脈瘤の治療のために入退院を繰り返していた。

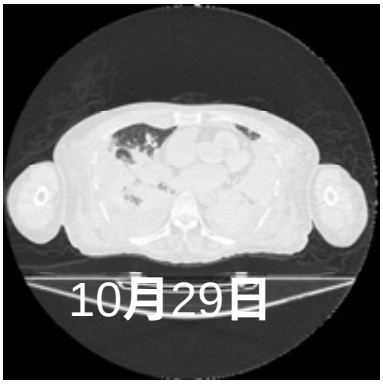
10月28日 夕方より熱感あり

10月29 日07:00am　39.9℃の発熱あり、氷枕等で対症対応（自宅）

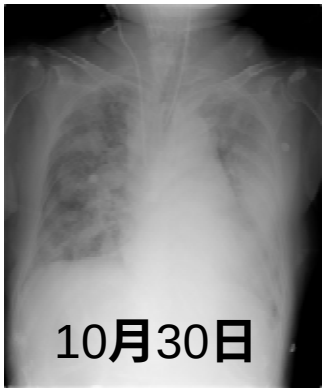
18:00 国立国際医療研究センターに救急搬送

救急搬送時、熱でフラフラはするが、意識はしっかりしていた。SmartAmpの研究にも「是非診ていただきたい」と患者自身の意志で判断した。合併症状は軽度の咳。来院時体温は37.9℃。免疫クロマト法では、本当にうっすらとラインが見て取れる状態で、救急部やその他のドクター達のほとんどは「陰性」と判定するほどであった。しかし、インフルエンザ対応として専用の個室に入院してもらいタミフルの投与を開始した。





9時間後（10月30日 3:00 a.m.）頃から呼吸状態の悪化と、高度の血圧低下があり、ICUへ移床して人口呼吸器管理下となった。免疫低下状態を背景とした敗血症性ショックの診断。血液由来製剤（アルブミン製剤や新鮮凍結血漿など）や、昇圧剤、ステロイド、タミフルの倍量投与（10/29の夜は結局嘔吐のため内服できていなかった）、エラスターゼ阻害薬などを使って治療。



10月30日の11:00 am（発症後28時間）に、鼻腔ぬぐいと気管支吸引物（血性分泌物）をとって免疫クロマトを再試行した。インフルエンザの経過として病状が悪化し、かつ発症からも時間が経

っているにもかかわらず、免疫クロマトの結果は「陰性」。しかし、SmartAmpの結果は入院時の検体（鼻腔ぬぐい：検体番号KK-15）、病状悪化時の検体（鼻腔ぬぐい:KK-16、気管支吸引物:KK-17）の3検体全て「新型H1N1 陽性」であった。体外循環を用いたエンドトキシン吸着療法や、CHDFも導入して救命を試みた。
翌10月31日 10:57 amに多臓器不全（主に循環不全）で永眠した。永眠の直前に保健所から連絡があり、RT-PCR陽性とのことで、公式に「新型インフルエンザ患者」として確定された。

死亡直後（発症後52時間）に採取した検体（鼻腔ぬぐい:KK-18、気管支吸引物（真っ赤な分泌物）:KK-19）も、免疫クロマト陰性、SmartAmp「新型A/H1N1 陽性」であった。
尚、本症例は、2009年11月2日の厚生労働省から「新型インフルエンザによる死亡例の発生について」と題してPress Releaseされた。

特別疾病征圧班医長である泉信有医師（国際疾病センター/呼吸器科）曰く「この症例は、SmartAmp法による検出が臨床の治療方針決定に重要な情報をもたらした事例となった。病院内の関係各所にもインパクトを与えた。最終的には患者「死亡」となり、SmartAmp法は最終予後には影響しなかったが、もしもSmartAmp法が無ければ、この患者は「新型インフルエンザ感染者」として認識されることもなく、敗血症を死因（肝硬変の患者にしばしば見られるパターン）として死亡とされていたことであろう。」

症例２（国立国際医療研究センター）
検体番号：KK-56, KK-57, KK-58, KK-59 （シークエンス解析によりタミフル耐性と認めた例）
東京在住の６歳9カ月の小児患者（女性）は季節性インフルエンザワクチンを２回済ませていた。
12月26日 新型インフルエンザワクチン接種のために近医を受信したところ、37.8℃の発熱を認めた。この時点ではインフルエンザの症状なく、元気であった。
12月27日 0:33 am頃、39.9℃まで体温上昇した。数回悪寒が見られたが、呼びかけには反応あり入眠していた。

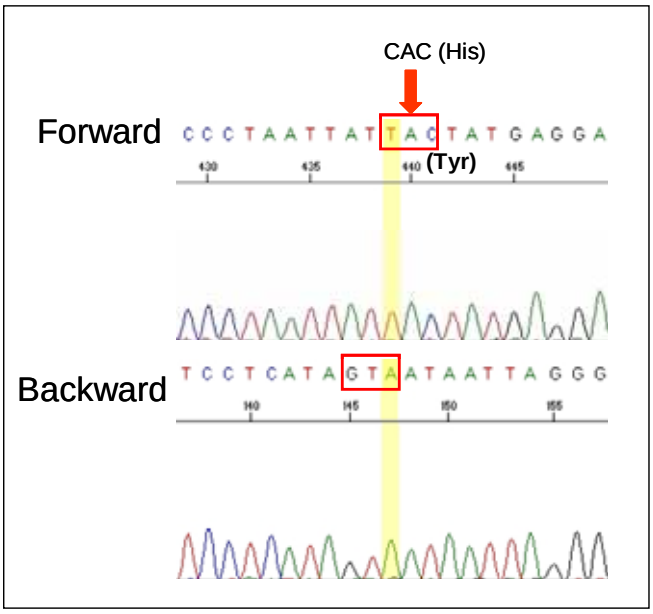
8:00 am頃、国立国際医療研究センターに外来受診し、待合にて強直間代性けいれんが出現した。救急外来入室時、両上肢は屈曲硬直し、呼びかけには反応しなかった。簡易検査（免疫クロマト）にてインフルエンザA型陽性。頭部CTにより著名な脳浮腫を認めた。インフルエンザ脳症と診断し、脳症ガイドラインに沿って治療を開始した。聴診上肺雑音著明であり、胸部X線にて右肺門部に肺炎像を認めたことから、インフルエンザ肺炎合併も示唆された。タミフル4mg/kg/dayを投与、ステロイドパルス施行。

13:00頃（発症後５時間）犬吠様咳と吸気時stridor、シーソー呼吸。デカドロン、エピネフリン吸入を開始したが、呼吸状態改善せず。

17:00頃（発症後９時間）著明な低酸素化をきたし、気管内挿管。筋弛緩の上、人工呼吸器管理とした。
12月28日 右上葉の無気肺、左肺門部の陰影が出現。喀痰PCRの結果、新型インフルエンザ陽性であることより、インフルエンザ重症肺炎・ARDSと判断。脳波に余波を認めたので、全身炎症

に対する脳保護を開始。
12月29日　再度頭部CT施行。びまん性能浮腫は改善傾向にあるものの依然存在した。
12月31日　再び酸素化が悪化。両肺野に著明なcrackleが出現。胸部X線上、無気肺は右上下葉と左下に拡大。気管支鏡下喀痰吸引を施行。気管支鏡で気管支の全周囲性浮腫と分泌物を確認。
鼻腔検体(KK-56)および気道分泌物(KK-57)をSmartAmp法で調べた結果、両検体とも新型インフルエンザ陽性。免疫クロマトでも両検体は陽性。
1月5日　２回目のステロイドパルス施行。
鼻腔検体(KK-58)および気道分泌物(KK-59)をSmartAmp法で調べた結果、KK-59検体では新型インフルエンザ陽性（免疫クロマトでは陰性）。
1月7日より有効な自発呼吸の増加。
1月8日　抜管し、酸素マスクでO_2投与。呼吸状態安定。頭部MRIで脳浮腫の存在を指摘。
1月12日　酸素投与中止。その後呼吸状態悪化することなく経過。
1月18日　脳血流シンチにて右側頭葉・頭頂葉の血流低下認められたが、その後は経過良好。
1月20日　ステロイド点滴の終了。
2月3日　　脳波に異常が認められなかった。
2月19日　退院。けいれん発症の可能性に注意しながら、外来による経過観察。

この患者は2009年12月27日に入院して、2010年2月19日に退院した。インフルエンザの治療としては異例に長い入院期間であった。この患者から採取した検体（検体番号：KK-56, KK-57, KK-58, KK-59）のシークエンス解析をした結果、NA分節にタミフル耐性の変異**C**AC→**T**AC (His275Tyr)が発見された。タミフル耐性の新型インフルエンザウイルスに患者が感染していた事が、治療を難しくしたとも考えられる。幸いなことに、タミフル耐性新型インフルエンザの患者家族への感染はなかった。



KK-56 検体で見つかったタミフル耐性の変異 CAC→TAC (His275Tyr)

INF0440 (KK-057)

Segment	working passes	Subtype	# of mutation(s)	Effect of mutation(s)
HA (fragment 2)	2/2	H1 pandemic	4	No effect on primers
HA (fragment 3)	2/2			
NA (fragment 2)	2/2	N1 pandemic	1	Known as the tamiflu-resistance mutation

> HA fragment 2 and 3 sequence

H1N1(new)_HA.txt: consensus sequence used for alignment

GATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTCATCATTTGAAAGGTTTGAGATATTCCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTTGAACAAAGGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAAT
TTAATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTTGTGCTATGGGGCATTCACCATCCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATAT
GTTTTTGTGGGGACATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACACTAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTCGAAGCAACTGGAAATCTAGTG
GTACCGAGATATGCATTCGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACTTGTCAGACACCCAAGGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTTCAGAATATACATCCGATCACAATT
GGAAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTAT
CACCATCAAAATGAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACAAGATTACTAACAAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTC

> NA fragment 2 sequence

H1N1(new)_NA.txt: consensus sequence used for alignment
CAA: zanamivir (relenza) resistance site (CAA>AAA ; Q136K)
CAC: oseltamivir (tamiflu) resistance site (CAC>TAC ; H274Y)

CCTTGGAATGCAGAACCTTCTTCTTGACTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAGACAGGAGCCCATATCGAACCCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCCTCTCCATACAACTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAG
CAAGTGCTTGTCATGATGGCATCAATTGGCTAACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAACGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATG
GTTCTTGCTTTACTGTAATGACCGATGGACCAAGTGATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATTACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTG
TGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTTTCGGAGACAATC

KK-57 検体の HA と NA 分節のシークエンスの一部。

2-13. まとめ

新型インフルエンザウイルス(2009 pandemic A/H1N1)を簡便で迅速かつ正確に検出する方法を開発し、早期診断・早期治療開始が可能な体制整備を行うことが必要である。我々は SmartAmp 法を応用し、新型インフルエンザウイルスを迅速に検出する方法を開発した。

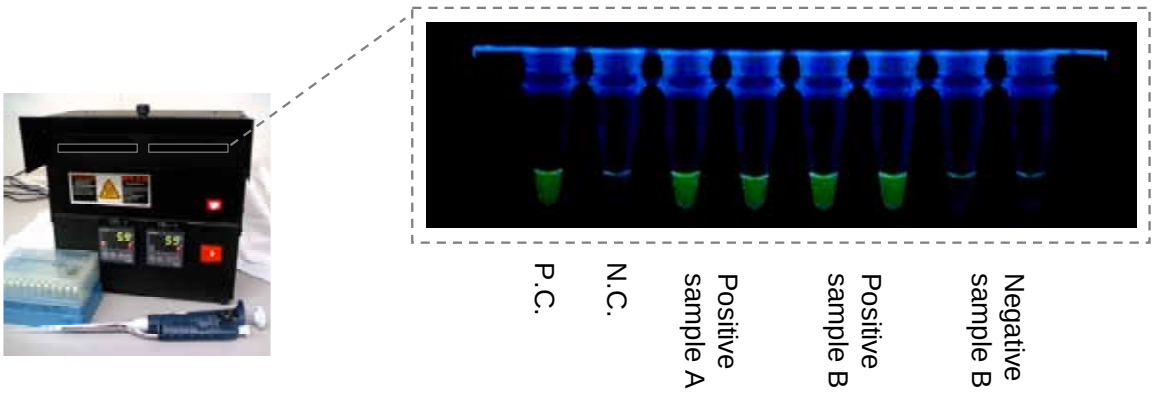
本臨床研究を始めるにあたって、新型インフルエンザのゲノム RNA の変異情報を蓄積し、HA 分節において変異頻度が低い領域と特異的に作用する SmartAmp プライマーをデザインした。そして、単離培養した新型インフルエンザウイルス株に対して、HA 分節を検出するプライマーを用いた SmartAmp 法は、検出感度において免疫クロマトよりも有意に高い感度を持つことが明らかになった。

新型インフルエンザウイルスの HA 分節を検出するプライマーは、季節性 A/H1N1、季節性 A/H3N2、B 型 のほか合計 66 種類の呼吸器感染性ウイルスと細菌には交叉せず、2009 pandemic influenza A/H1N1 に対して極めて特異性が高いことが明らかになった。一方、鼻腔ぬぐい液検体中には反応を阻害する物質が混在しているが、簡単な前処理を使うことによりウイルス RNA を SmartAmp 法で迅速かつ効率的に検出できるようになった。

７か所の医療機関で臨床研究を実施し、臨床現場での有用性（感度、簡便性、迅速性）を検証した。免疫クロマト法で「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定された症例について、患者の症状（体温）と臨床データ（発熱からの時間）を連結させて検討をおこなった。その結果、発熱から来院までの時間は症例にごとに異なるが、早い場合、発熱から数時間で新型 A インフルエンザウイルスを SmartAmp 法で検出できることが明らかになった。以上の事から、SmartAmp 法は、免疫クロマト法と比較して新型インフルエンザウイルスを感度良く検出できると結論づけられた。

またさらに、高価なリアルタイム PCR 装置を使わなくても、条件を最適化することによって SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルスの検出を目視で行うことの足掛かりを得た（下図参照）。今後の課題は、大規模の総合病院だけでなく地方の診療所でも SmartAmp 法による新型インフルエンザのタミフル耐性ウイルスを検出できるように、臨床応用体制を整備していくことである。

本研究で開発した方法に関して臨床現場での実用化を図るために、当該プロジェクトにおける基礎研究、臨床検体を用いた研究、および千葉県立東金病院といすみ医療センターで実施した臨床研究のデータを、理化学研究所の知的財産戦略センターから株式会社ダナフォーム（理化学研究所発のベンチャー）に提供した。SmartAmp 法の独占実施権を有する株式会社ダナフォームは体外診断用医薬品としての薬事申請を目指す。



2-14. 参考文献

1. Mitani Y, Lezhava A, Kawai Y, Kikuchi T, Oguchi-Katayama A, Kogo Y, Itoh M, Miyagi T, Takakura H, Hoshi K, Kato C, Arakawa T, Shibata K, Fukui K, Masui R, Kuramitsu S, Kiyotani K, Chalk A, Tsunekawa K, Murakami M, Kamataki T, Oka T, Shimada H, Cizdziel PE, and Hayashizaki, Y. (2007) Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nat. Methods* 4(3), 257-262.
2. Mitani Y, Lezhava A, Sakurai A, Horikawa A, Nagakura M, Hayashizaki Y, and Ishikawa T. A rapid and cost-effective SNP detection method: Application of SmartAmp2 to pharmacogenomics research. (2009) *Pharmacogenomics* 10(7): 1187-1197.
3. Neumann G, Noda T and Kawaoka Y (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459(7249): 931-939.
4. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM. (2009) Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 360(25):2605-2615.. Erratum in: *N Engl J Med.* 2009 361(1):102.
5. Krug RM and Aramini JM (2009) Emerging antiviral targets for influenza A virus. *Cell* 30(6): 269-277.
6. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, and Kawaoka Y. (2009) In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*. 460(7258):1021-1025.
7. Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, Wadford DA, Pappas C, Zeng H, Gustin KM, Pearce MB, Viswanathan K, Shriver ZH, Raman R, Cox NJ, Sasisekharan R, Katz JM, and Tumpey TM. (2009) Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science*. 325(5939):484-487.
8. Ikeda S, Kubota T, Yuki M, and Okamoto A. (2009) Exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent probes: multicolor detection of nucleic acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48: 6480-6484.
9. Lezhava A, Ishidao T, Ishizu Y, Naito K, Hanami T, Tatayama A, Kogo Y, Soma T, Ikeda S, Murakami K, Nogawa C, Itoh M, Mitani Y, Herbers M, Okamoto A, and Hatyashizaki Y. (2010) Exciton primer-mediated SNP detection in SmartAmp2 reactions. *Hum. Mut*. 31: 208-217.
10. Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, St George K, Hatta M, Kawaoka Y, and Wentworth DE. (2009) Single Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J. Virol.* 83(19):10309-10313.

付録資料１

SmartAmp 法を用いたインフルエンザウイルスの検出と診断への応用に関する研究

最終報告書

臨床研究責任者
千葉県立東金病院
院長：平井　愛山

臨床研究担当医師
千葉県立東金病院
内科：林　栄治

臨床検査担当責任者
千葉県立東金病院
臨床検査科長：鶴岡　成一

研究統括
理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域
領域長：林崎 良英

SmartAmp 技術開発担当責任者
理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域
客員研究員　川井 雄輝

インフルエンザプロジェクト研究責任者
理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域
客員主管研究員：石川 智久

文責：石川智久

目 次

1. 要旨 46
2. 研究組織と臨床研究の経緯 47
3. 研究の背景と意義 50
4. 研究の目的 53
5. 臨床研究における法令順守 53
6. 対象症例の選択 54
7. 収集する臨床データ 54
8. 患者に対する説明と同意の取得 54
9. 披験者の登録と披験者情報の管理 55
10. 研究デザイン 55
11. 研究方法 57
11-1. 免疫クロマト法による判定 57
11-2. SmartAmp 法によるインフルエンザウイルスの検出 57
11-3. ウイルス塩基配列解析のため凍結検体を理化学研究所へ搬送 59
11-4. 理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域の受け入れ体制 59
11-5. 検体の処理とインフルエンザウイルスのシークエンス解析 60
12. 臨床研究の結果 62
12-1. 検体の採取 62
12-2. SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出：「陽性」と「陰性」判定基準 62
12-3. 免疫クロマトと SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の比較 63
12-4. 免疫クロマト「陰性」 vs. SmartAmp 法「陽性」の検体と詳細な解析 64
12-5. SmartAmp 法「陽性」と臨床データの関連づけ 65
12-6. 症例報告 66
12.7. シークエンス解析の結果と方法の改良 69
12-8. SmartAmp 法による新型 A インフルエンザウイルスの目視測定の可能性 70
13. 考察 71
14. 謝辞 72
15. 参考文献 72
16. 添付資料 74
添付資料 1. 千葉県東金病院における臨床研究の結果一覧 74
添付資料 2. 分節特異的ＰＣＲの増幅範囲 77
添付資料 3. 分節特異的ＰＣＲのプライマー塩基配列 78

1. 要旨

千葉県立東金病院と山武郡市の１２の診療所において、平成２１年１０月１３日から１１月２０日の期間において、発熱がありインフルエンザ感染が疑われる外来患者を対象として、SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の臨床研究を実施した。患者から採取した鼻腔ぬぐい液検体（インフォームドコンセントと連結可能匿名化済み）を使い、免疫クロマト法による A 型インフルエンザウイルスの検出、および SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルスの検出を行った。そして免疫クロマト法と SmartAmp 法の結果を比較検討した。

合計１６１検体のうち、７３検体は免疫クロマト法と SmartAmp 法で共に「陽性」と判定された。また６２検体は、免疫クロマト法と SmartAmp 法で共に「陰性」と判定された。一方、免疫クロマト法で「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定されたのは２１検体。免疫クロマト法で「陽性」と判定されて、SmartAmp 法で新型 A インフルエンザ「陰性」と判定されたのは５検体あった。ウイルスゲノムの塩基配列解析および定量的 PCR によって SmartAmp 法の結果を検証して、その結果の裏付けをとった。

免疫クロマト法で「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定された症例について、患者の症状（体温）と臨床データ（発熱からの時間）を連結させて検討をおこなった。その結果、発熱から来院までの時間は症例ごとに異なるが、早い場合、発熱から数時間で新型 A インフルエンザウイルスを SmartAmp 法で検出できることが明らかになった。したがって SmartAmp 法は、免疫クロマト法と比較して新型インフルエンザウイルス(2009 pandemic influenza A/H1N1)を感度良く検出できると結論づけられた。

また本臨床研究において、SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルスの検出を目視で行う試行も実施した。60°C で 45 分間 SmartAmp 反応を実施して、その結果を実際に目で観察して確認することが可能になった。

尚、本研究は、理化学研究所および千葉県立東金病院の倫理審査委員会で承認を得て、両者間で共同研究契約を締結して実施したものである。また GCP に準拠してデータの信頼性を担保し、当該臨床研究に参加する患者の同意の下で実施した。実施にあたっては、文部科学省、厚生労働省および経済産業省において共同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」と厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針（平成２０年７月３１日改正）」および「ヘルシンキ宣言（2008 年改訂）」を遵守して行った。

2.　研究組織と臨床研究の経緯

臨床研究実施機関：千葉県立東金病院と１２の診療所

臨床研究責任者

平井　愛山	千葉県立東金病院　院長

臨床研究担当医師

林　栄治	千葉県立東金病院　内科

研究協力医師

今村　茂樹	千葉県立東金病院　内科副部長
古垣　斉拡	千葉県立東金病院　内科医長
天野　豊	天野内科クリニック（東金市）
伊藤　俊夫	伊藤医院（山武市）
岡崎　信彦	岡崎医院（東金市）
金子　昇	松尾クリニック（山武市）
加部　恒雄	山武市日向診療所（山武市）
佐久間　猛	佐久間医院（大網白里町）
佐藤　成信	北辰堂佐藤医院（東金市）
高橋　一	高橋医院（九十九里町）
田畑　陽一郎	医療法人明生会（東金市ほか）
西田　泉	西田医院（東金市）
埴谷　一夫	はにや内科（大網白里町）
古川　洋一郎	古川クリニック（九十九里町）
岡嶋　良知	千葉県立東金病院　小児科
加賀谷　浩基	千葉県立東金病院　内科
山本　高義	千葉県立東金病院　内科
庭瀬　亜香	千葉県立東金病院　内科
染谷　知宏	千葉県立東金病院　小児科
鶴岡　昭久	千葉県立東金病院　内科
那須　由美子	千葉県立東金病院　内科

臨床検査担当責任者・検体管理者（臨床研究実施機関）

鶴岡　成一	千葉県立東金病院　臨床検査科長

個人情報管理者（臨床研究実施機関）

外口　徳美致	千葉県立東金病院　地域医療連携室

個人情報管理補助者（臨床研究実施機関）

前田　宏美　　千葉県立東金病院　地域医療連携室

理化学研究所　横浜研究所

研究実施統括

林崎良英　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　領域長

インフルエンザプロジェクト研究責任者

石川智久　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　客員主管研究員

SmartAmp 技術開発担当責任者

川井雄輝　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　客員研究員

GeNAS 運営管理者・シークエンス解析研究責任者

河合　純　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　副領域長

GeNAS 信頼性保証部門

真鍋理一郎　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　上級研究員

インフルエンザウイルスゲノム解析担当研究者

Jean-Etienne Morlighem　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　技術員

研究事務局

理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域
インフルエンザプロジェクト臨床研究事務局
統括責任者　石川智久
〒230-0045
横浜市鶴見区末広町 1-7-22
電話：045-503-9179　Fax：045-503-9216

臨床研究の経緯

臨床研究計画書（第 2 版 2009 年 9 月 23 日）

共同研究契約書（契約日 2009 年 10 月 13 日）

倫理委員会申請（2009 年 9 月 24 日）
倫理委員会開催（2009 年 9 月 28 日）
倫理委員会の承認（2009 年 10 月 9 日）

臨床研究の開始（2009 年 10 月 13 日）
臨床研究の終了（2009 年 11 月 20 日）

最終報告書（2010 年 1 月 25 日）

3. 研究の背景と意義

近年、これまでになかった危険な、あるいは高い感染能力をもつインフルエンザウイルスのパンデミックな流行が、世界的な問題となっている。世界保健機関（WHO）は、新型インフルエンザの警戒水準（フェーズ）を最高度の「６」に引き上げ、世界的大流行（パンデミック）が発生したと宣言した。チャン事務局長は記者会見で「これは 2009 インフルエンザ・パンデミックである」と表明した。新型インフルエンザの世界的大流行は 1968 年に発生した「香港風邪」以来 41 年ぶりである。

インフルエンザウイルスとは、オルトミクソウイルス科に分類されるウイルスのうち、A 型インフルエンザウイルス、B 型インフルエンザウイルス、C 型インフルエンザウイルスの 3 属を指す。特に、A 型は内部での変異型が多く世界的な大流行を起こしやすい。インフルエンザウイルス遺伝子は１本鎖 RNA である。A 型インフルエンザウイルスの RNA ゲノムは 8 分節 (HA, NA, PA, PB1, PB2, M, NP, NS) からなる。HA, haemagglutinin; NA, neuraminidase, PA, RNA polymerase a; PB1, RNA polymerase b1 ; PB2, RNA polymerase b2; M, matrix; NP, nucleoprotein, NS, non-structure.

A 型インフルエンザウイルスでは、特に HA と NA のゲノムに変異が多く、これまで HA に 16 種類、NA に 9 種類の大きな変異が見つかっており、その組み合わせの数の亜型が存在しうる。亜型の違いは H1N1 - H16N9 といった略称で表現されている。ヒトのインフルエンザの原因になることが明らかになっているのは 2009 年現在で、「A ソ連型」として知られている H1N1、「A 香港型」として知られている H3N2、H1N2、H2N2、の 4 種類である。この他に H9N1、高病原性トリインフルエンザとして有名になった H5N1 などのいくつかの種類がヒトに感染した例が報告されているが、ヒトからヒトへの伝染性が低かったため大流行には至っていない。しかし、いずれ新型インフルエンザが定期的に大流行を起こすことは予言されつづけてきた。

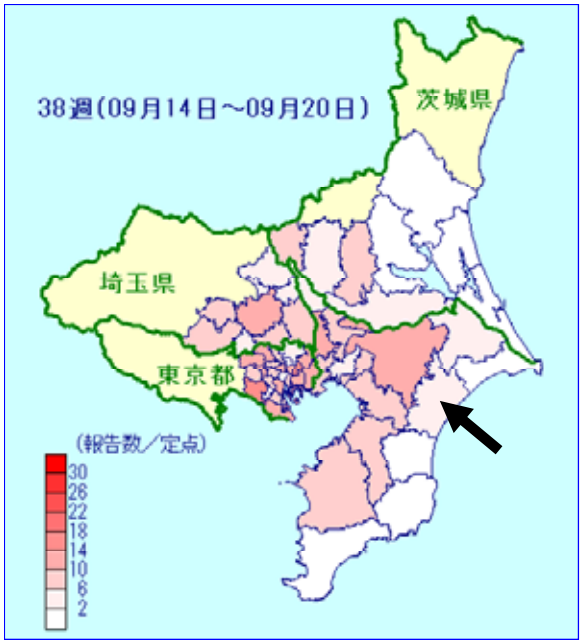
今年メキシコや米国等で確認された新しい豚インフルエンザ（H1N1）を感染症法第 6 条第 7 号に規定する新型インフルエンザ等感染症に位置づけ、感染の拡大を防止するための様々な対応が国際的な連携のもとに始められている。新型インフルエンザは、その遺伝子が豚インフルエンザのものに似ていることから、確認当初は豚インフルエンザ(Swine A/H1N1)と呼ばれた。しかしその後の研究で、今回のインフルエンザウイルスが豚インフルエンザウイルスの遺伝子のほかに、鳥インフルエンザウイルス及びヒトインフルエンザウイルスの遺伝子も持つことが確認されている [1-3]。

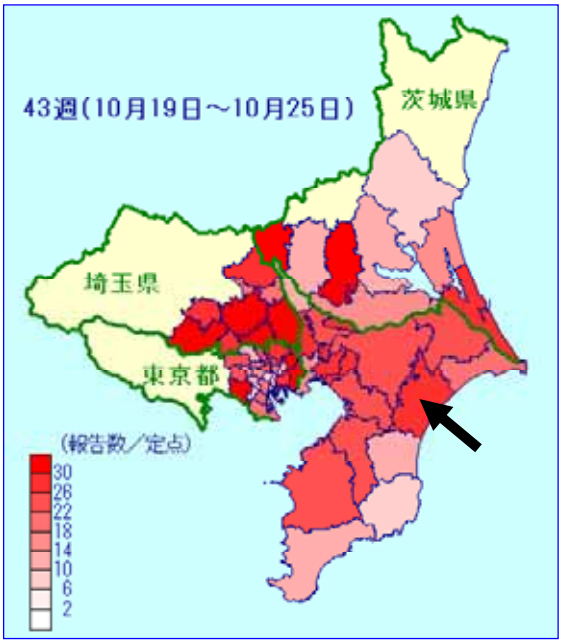
今回のブタ由来の新型インフルエンザは、季節性インフルエンザと類似していると考えられているものの、一部に重篤化する症例がみられており、注意が必要である。サルを用いた実験では、季節性インフルエンザウイルスは、咽頭や扁桃、気管、気管支、肺の一部で増殖し

たのに対して、新型インフルエンザウイルスは鼻粘膜、咽頭、扁桃、気管、気管支、肺のすべての部分で増殖した。季節性インフルエンザに比較して新型インフルエンザウイルスの方が 10 倍から 1 万倍程度感染力が強いと考えられている [4,5]。

PCR による遺伝子診断を行った患者の 98.7%が新型インフルエンザである。年齢別にみると、5～9 歳が最多で 5 万 8553 人、次いで 10～14 歳が 5 万 3268 人（33.4%）、0～4 歳 1 万 9053 人（11.9%）の順である。11 月 9 日、国立感染症研究所は、10 月 26 日～11 月 1 日の 1 週間のインフルエンザ患者の報告数で、5～9 歳が 36.7%を占め、それまで流行の中心だった 10～14 歳を上回ったと発表した。5～9 歳は重症化する傾向があり、注意が必要である。

糖尿病や喘息等の基礎疾患がある患者等を中心に重症化する例が報告されている。さらにタミフル耐性の新型インフルエンザウイルスの検出は１０月までに１２例となった。いずれも単発例であり、周囲への感染拡大は認められていないが、要注意である。また下の図に示すように、９月から１０月にかけて千葉県内でもインフルエンザ報告数/定点が顕著に増加した。

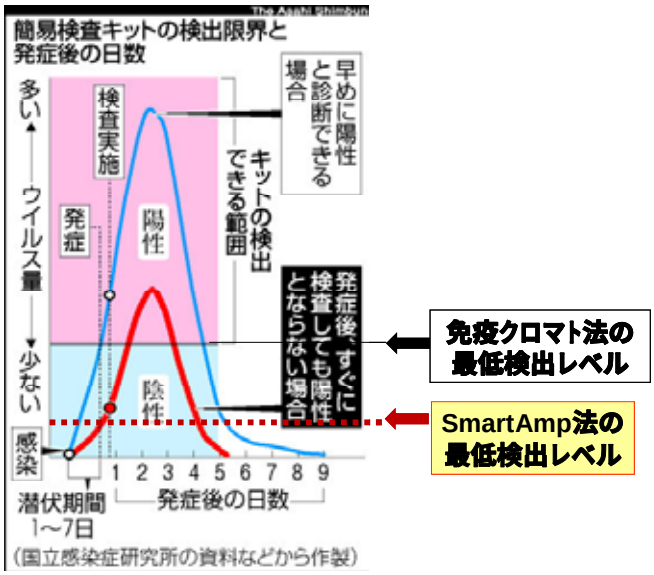




特に妊婦、小児および糖尿病や喘息等の基礎疾患がある患者においては、早期の診断が極めて重要である。したがって、新型インフルエンザウイルスを迅速かつ高感度に検出する方法の確立は焦眉の急である。

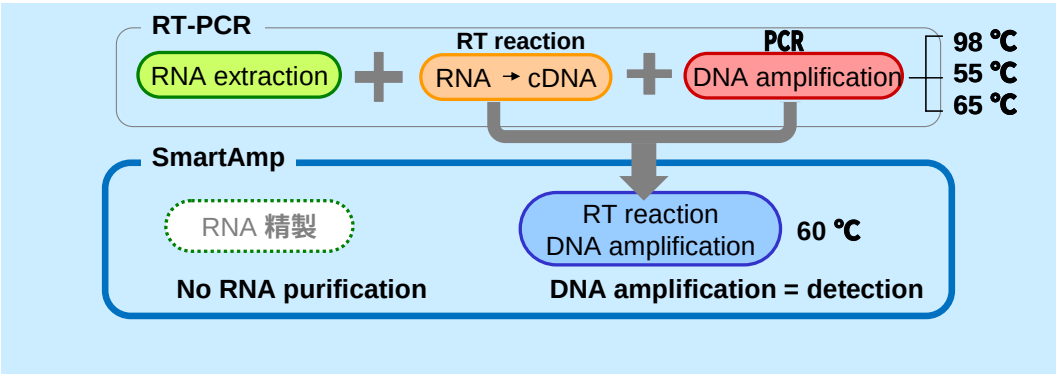
理化学研究所オミックス基盤研究領域（理研 OSC）は、ヒト由来試料（鼻腔ぬぐい液検体）を用いて、SmartAmp 法により、ウイルスの検出を迅速簡便に同定できるシステムの開発に取り組んできた。SmartAmp 法は、理研が開発した遺伝子検出法で、ターゲットとする配列

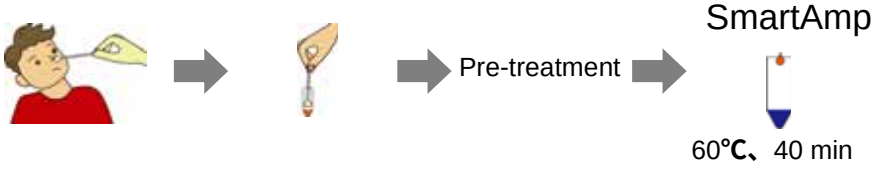
の核酸のみを増幅させることにより、その存在を検出する方法である[6,7]。　今回、開発しているキットは、検体採取後、比較的簡単な手技で約 1 時間以内に新型インフルエンザウイルスに特有の遺伝子配列を増幅して、検出することができるものである。



免疫クロマト法で陽性と判断された患者のスワブ（Swab）検体および単離培養したインフルエンザウイルス株（共同研究契約を締結した医療機関および横浜市衛生研究所より提供）を用いて、新型インフルエンザウイルスの検出に最適のプライマーを調整した。その結果、*in vitro* の実験では、SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の感度は従来の簡易検出キット（免疫クロマト法）の感度よりも有意に高く、且つ新型インフルエンザウイルスに特異的で、他のインフルエンザウイルス（季節性 A 型、B 型など）とは交差反応しないことが判明した。

理化学研究所で独自に開発した SmartAmp 法（Smart Amplification Process）を活用することで、亜型同定のための核酸抽出処理が不要となり、迅速・簡便・安価なウイルス同定システムを開発することができ、パンデミックの際に迅速な対応が可能となる。同時にインフルエンザウイルスのゲノム塩基配列を確認することで、SmartAmp 法の確実性が検証可能となる。具体的には例えば、従来の季節性インフルエンザと新型インフルエンザを区別して検出することが可能となる。さらに、将来的には、タミフル耐性ウイルスの検出も含めて 1 時間以内に同定が可能となると考えられる。





4. 研究の目的

主目的：

本臨床研究の目的は、SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の有効性を臨床現場で検証することである。そのため、発熱がありインフルエンザ感染が疑われる患者を対象として、その患者から鼻腔ぬぐい液検体（連結可能匿名化済み）を採取して、免疫クロマト法（(株)富士レビオ：インフルエンザウイルスキット、(株)タウンズ：イムノエース Flu 等）で A 型インフルエンザ抗原検出を行う（千葉県立東金病院と山武郡市の１２の診療所）。一方、同一患者から鼻腔ぬぐい液検体を別途採取し（千葉県立東金病院と山武郡市の１２の診療所）、SmartAmp 法によって新型および季節性インフルエンザウイルスを検出する（千葉県立東金病院）。そして、インフルエンザを検出する免疫クロマト法と SmartAmp 法の結果を比較検討する。

副次的目的：

（１）必要があれば、鼻腔ぬぐい液検体中のウイルスゲノムのシークエンス解析を行う（理化学研究所横浜研究所　GeNAS に委託）。

（２）SmartAmp 法の結果とゲノムシークエンス結果を比較し、SmartAmp 法による検出の正確度を検証する（理化学研究所横浜研究所）。

（３）ウイルスゲノムのシークエンス解析の結果、タミフル耐性の変異が発見された場合、理化学研究所のインフルエンザプロジェクト研究責任者が千葉県立東金病院の臨床研究担当医師に連絡する。

5. 臨床研究における法令遵守

新型インフルエンザ H1N1 ウイルスを迅速且つ高感度で検出する体外診断法の開発を目標として、SmartAmp 法の実用性を臨床現場で検証する自主臨床研究である。具体的には、インフルエンザ患者の Swab サンプル（鼻腔ぬぐい液検体）を用いて、新型インフルエンザ A/H1N1 ウイルスを SmartAmp 法によって検出する。本臨床研究の計画書は、千葉県立東金病院の倫理委員会で審査され 2009 年 10 月 9 日に承認された。

本研究は、文部科学省、厚生労働省および経済産業省において共同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」と厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針（平成２０年7月３１日改正）」および「ヘルシンキ宣言（2008 年改訂）」を遵守した。また GCP に準拠してデータの信頼性を担保し、当該臨床研究に参加する患者の同意の下で実施する。さらに、国立感染症研究所の「新型インフルエンザウイルス検査対応指針と検体搬送のガイドライン（2009 年 5 月 3 日　暫定版）」を遵守した。

臨床研究責任者、臨床研究担当医師および研究協力者が本研究に係る医療情報および同意書等を取扱う際は、対象患者の秘密保護に十分配慮した。理化学研究所内で取り扱うデータは、臨床研究実施機関が付ける患者整理番号により連結可能匿名化を行なったデータのみとした。研究結果を公表する際は、対象患者を特定できる情報を含まない。

6. 対象症例の選択

対象患者

発熱がありインフルエンザ感染が疑われる患者

選択基準

下記①②の条件を満たす被検者

①インフルエンザ様症状を呈した患者

＊インフルエンザ様症状とは以下の 1)かつ 2)を満たすもの

1) 37.5℃以上の発熱

受診時に限定するものではなく、経過中の最高体温が 37.5℃以上

2) 急性呼吸器症状などの臨床症状

咳、咽頭・喉頭痛、倦怠感、喀痰、鼻汁・鼻閉、頭痛など

② 本人、またはその代諾者から書面にて同意が得られた被検者

除外基準

① 他の医療機器・薬剤の治験に参加しているか、もしくは治験終了後 3 ヶ月が経過していない患者

② その他、臨床研究担当医師が不適当と判断する患者

7. 収集する臨床データ

収集する臨床データとしては：患者の年齢、性、身体所見（身長、体重)、体温、インフルエンザ特有の症状（発熱、咳、咽頭痛、倦怠感、喀痰、鼻汁・鼻閉、頭痛、関節痛等）および薬の服用の有無、薬の名称（服用した場合）と服用量などを含む。

妊婦、幼児、高齢者、慢性呼吸器疾患・慢性心疾患・代謝性疾患（糖尿病等)・腎機能障害・免疫機能不全（ステロイド全身投与等）等を有しており、治療経過や管理の状況等を勘案して医師により重症化のリスクが高いと判断される被験者は、臨床データに特記する。

研究担当医師および研究協力者が本研究に係る医療情報および同意書等を取り扱う際は、対象患者の秘密保護に十分配慮する。提出するデータは、患者整理番号により連結可能匿名化を行ったデータのみとする。研究結果を公表する際は、対象患者を特定できる情報を含まないようにする。本研究の目的以外に、研究で得られたデータを原則的に使用しない。

8. 患者に対する説明と同意の取得

千葉県立東金病院あるいは研究協力施設（山武郡市の１２の診療所）を受診した患者で、発熱がありインフルエンザ感染が疑われるものに対して当該臨床研究について臨床研究担当医師または研究協力医師が説明を行い、臨床研究に参加する同意を示す書面（同意書：インフォームドコンセント）を患者から頂く。

9.　披験者の登録と披験者情報の管理

臨床研究実施医療機関の臨床研究担当医師あるいは研究協力者は、対象条件（4. 対象症例の選択）を満たす患者（被験者）を所定の登録用紙に記入し、個人情報管理者に提出する。個人情報管理者は被験者の登録を行い、臨床研究担当者に連結可能匿名化のための割付番号を連絡する。その連絡を受けて、臨床研究担当者は本研究のためのスワブ処理を開始する。被験者の臨床情報は、臨床研究実施医療機関の臨床研究担当医師あるいは研究協力医師が管理する。

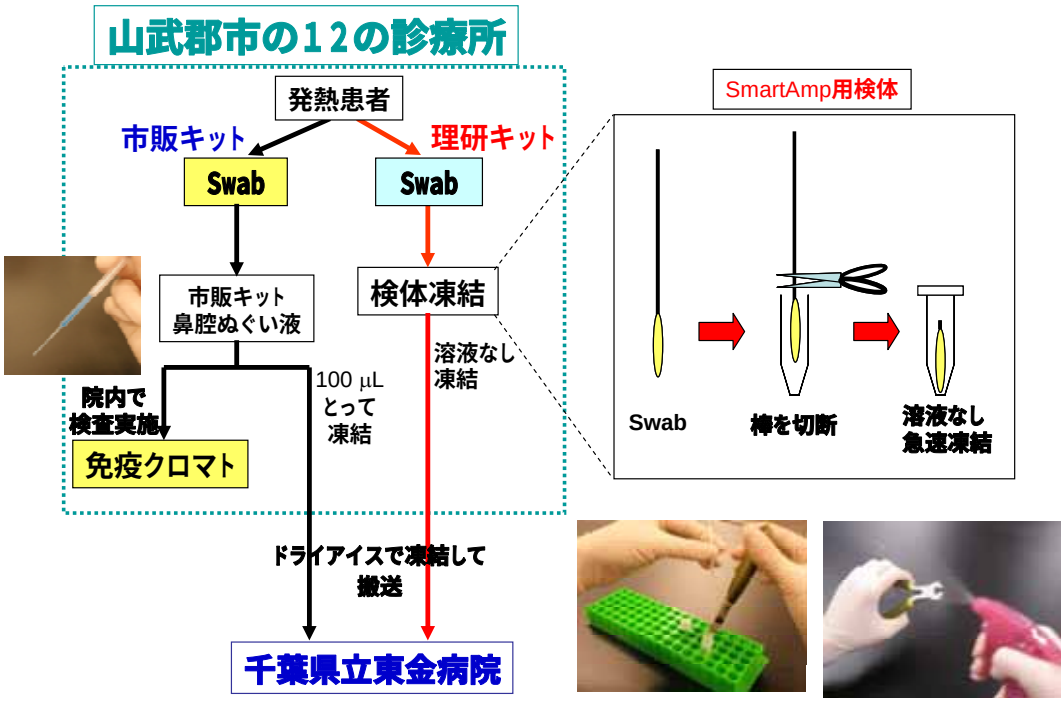
10.　研究デザイン

患者から採取された鼻腔ぬぐい液検体（連結可能匿名化済みサンプル）を用いて、免疫クロマト法でA型インフルエンザ陽性か陰性かの判定を行う。免疫クロマト法による判定には、市販のキット（(株)富士レビオ：エスプラインインフルエンザ®A&B-N キット、(株)タウンズ：イムノエース Flu 等）を用いる。

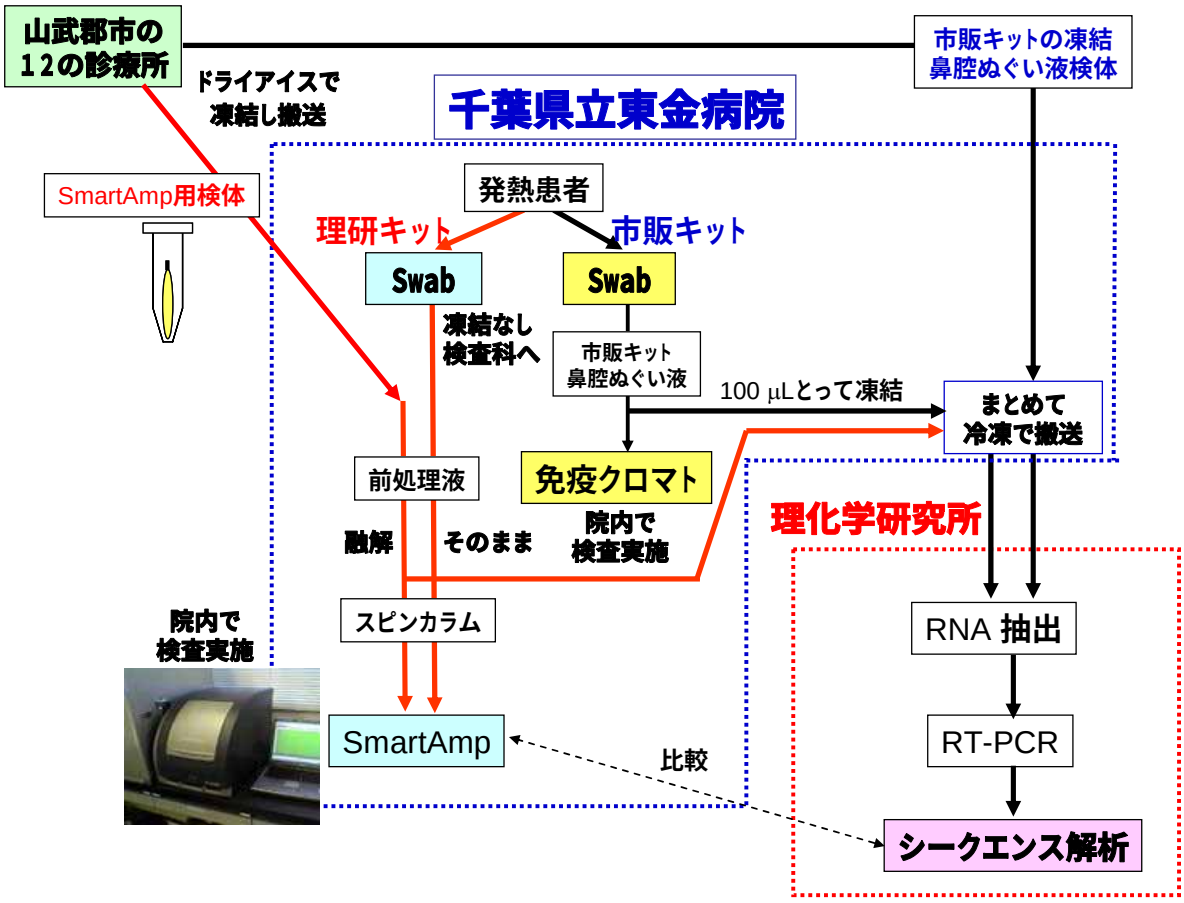
免疫クロマト検査後、残りの鼻腔ぬぐい液検体（市販キット）から約 100 µl を無菌チューブ（理化学研究所から提供）に移し、ドライアイス等で凍結する。その検体を千葉県立東金病院が取りまとめて、理化学研究所横浜研究所・オミックス基盤研究領域に搬送する。その際、国立感染症研究所の「新型インフルエンザウイルス検査対応指針と検体搬送のガイドライン（2009 年 5 月 3 日　暫定版）」を遵守し、臨床検体搬送業者に委託する。

一方、SmartAmp 用綿棒（理研から提供されたキット）を用いて、同一患者から別途鼻腔ぬぐい液（スワブ検体）を採取する。研究協力施設（山武郡市の１２の診療所）では、その検体をドライアイス等で凍結し、千葉県立東金病院に搬送する。

千葉県立東金病院と山武郡市の１２診療所の地理的位置



山武郡市の診療所における Swab 検体の採取方法と東金病院への搬送



千葉県立東金病院における検体の採取と診療所からの検体の検査方法

千葉県立東金病院では、研究協力施設から搬送された検体および同病院で採取した検体に対して、前処理を行った後、SmartAmp 法で直接インフルエンザウイルスを検出する。この検出によって、新型または季節性の A 型インフルエンザウイルス陽性・陰性を判定する。

理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域では、千葉県立東金病院から搬送された鼻腔ぬぐい液検体（免疫クロマト検査で残った約 100 µl の凍結検体および SmartAmp 検出後の残り液の凍結検体）を受理し、融解して RNA 抽出したあと、multi-segment RT-PCR による RNA→cDNA 生成と分節特異的 PCR による DNA 増幅をおこなう。そして PCR で増幅した DNA をシークエンス解析する。それらの結果を、SmartAmp 法によるインフルエンザウイルス検出結果と比較することにより、SmartAmp 法の正確さを検証する。必要な場合には、定量的 RT-PCR により新型インフルエンザウイルスの有無を確認する。

11. 研究方法

11-1. 免疫クロマト法による判定（千葉県立東金病院と山武郡市の１２の診療所）

免疫クロマト法により A 型インフルエンザウイルスの陽性・陰性を判定する。その手順と方法については、市販のキットの添付文書の方法に従うものとする。

検体採取 #1（**免疫クロマト法検査用**）：

市販のキット（(株)富士レビオ　エスプラインインフルエンザ®A&B-N キット、(株)タウンズ：イムノエース Flu 等）に付属する滅菌綿棒を用いて、鼻腔粘液を採取する。その際、添付文書の方法に従う。

検体容器には検体番号のみを記載し、被検者を特定できる情報を記入しない。研究本部に提出するデータは、各医療機関がそれぞれ付ける検体番号により連結可能匿名化を行なったデータのみとする。

11-2. SmartAmp 法によるインフルエンザウイルスの検出（千葉県立東金病院）

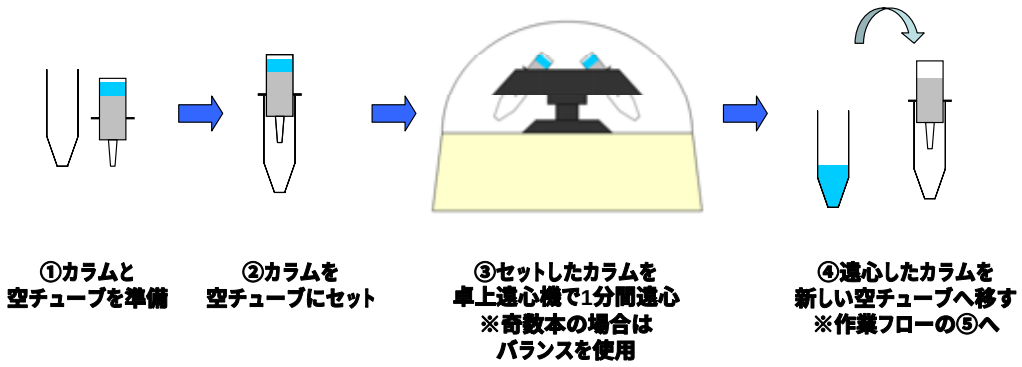
検体採取 #2（**SmartAmp 法検出用**）：

同一患者の別の鼻の穴から理研キットの滅菌綿棒を用いて、鼻腔からスワブ検体を採取する。その方法は原理的には上述の市販キットを用いた検体採取と同じである。

SmartAmp 法の手順は「SmartAmp 新型インフルエンザ(A/H1N1)ウイルス検出キット:検査の準備と手順」に従う。

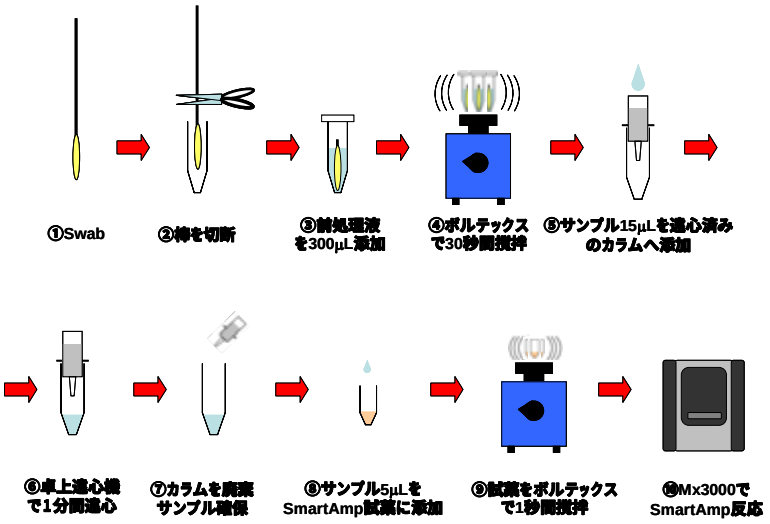
【カラムの準備】

１．１検体につき、カラム１本、空のチューブ２本を用意。
２．カラムのツメを折って、空のチューブにセットする。
３．チューブにセットしたカラムを小型卓上遠心機で１分間遠心。
４．カラムを新しい空チューブに移し、これを「準備済みカラム」とする。



【前処理操作】

1．綿棒を所定のカッターで切断し、綿部分を滅菌チューブにいれる。（下図を参照）
2．検体を入れたチューブに前処理液 300 μL を入れる。
3．しっかりと蓋を閉め、ボルテックスミキサーで 30 秒間撹拌する。
4．「準備済みカラム」の蓋を開け、**サンプル液** 15 μL を滴下する。
5．そのカラムを小型卓上遠心機で 1 分間遠心する。
6．カラム部分を取り外し、チューブに残った液を**処理済みサンプル**とする。



【試薬の準備】

1．-20℃で保存したキット試薬を室温で解凍し、すぐにクーラーラックに移す。
　使用する分（検体数＋2 テスト分）だけ取り出し、そのほかの試薬は絶対に解凍しない。
2．使用する試薬すべて小型卓上遠心機でスピンダウンする。
3．試薬が飛び散らないように静かに蓋を外す。
4．**処理済みサンプル** 5 μL を検体用試薬チューブに添加する。最終量：25 μl。
5．陽性コントロール用チューブに陽性コントロール試薬を 5 μL 添加する。(最終量：25 μl)
6．陰性コントロール用チューブに陰性コントロール試薬を 5 μL 添加する。(最終量：25 μl)
7．蓋をしっかりと閉め、十分にタッピング後スピンダウンする。

【SmartAmp 反応】

1．リアルタイムPCR 装置を用いて、上述のSmartAmp反応サンプルを60℃で反応させる.
（装置の設定方法および操作方法は装置の取扱説明書を参照。）
2．40分後の蛍光強度が3000を超えた場合、陽性と判断し、それより以下は陰性と判断する。

11-3.ウイルス塩基配列解析のため凍結検体を理化学研究所へ搬送（千葉県立東金病院）

免疫クロマト検査後、残りの鼻腔ぬぐい液検体（市販キット）から約 100 µl を取り出し、無菌チューブ（理化学研究所から提供）に移し、ドライアイス等で凍結する。さらに SmartAmp 検出後、その残液も凍結する。山武郡市の１２の診療所はそれらの検体を千葉県立東金病院に冷凍で搬送し、同病院が取りまとめて、理化学研究所横浜研究所・オミックス基盤研究領域にさらに搬送する。

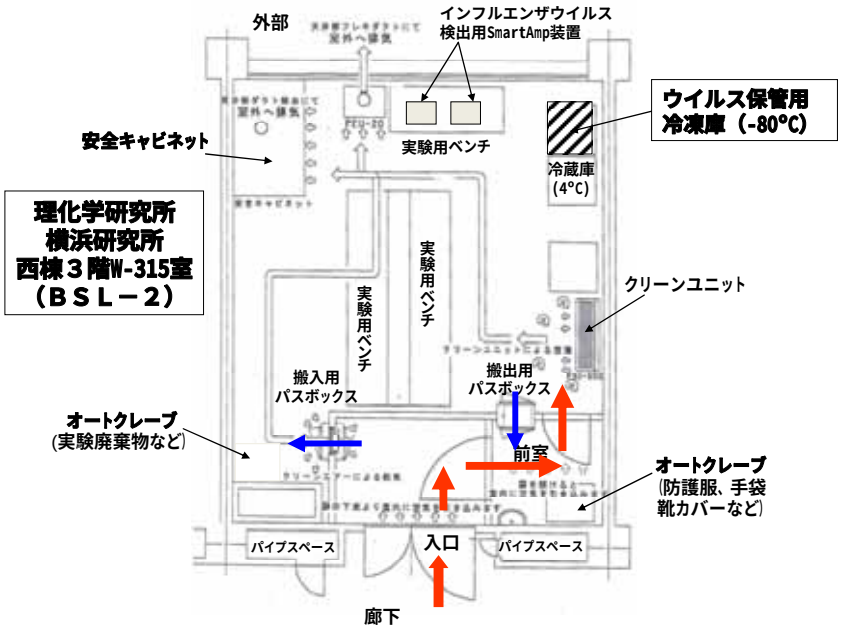
これらの搬送は、凍結検体をドライアイスとともに搬送する。インフルエンザ患者から採取した臨床検体はカテゴリーB扱いとする。理化学研究所横浜研究所より供与されるウイルス検体搬送用容器（バイオセーフティーパック DSP150*）を用いて、搬送専門業者により速やかに検体搬送を行う。

＊バイオセーフティーパック DSP150*

感染性物質や菌体の輸送用に開発された容器で、吸収剤、エアーキャップ、エアーキャップバッグ、緩衝材、緩衝板、95kPa 耐圧二次容器、外装容器からなる。この搬送容器は空路、陸路、航路における輸送を目的とした規定（国立感染症研究所「新型インフルエンザウイルス検査対応指針と検体搬送のガイドライン」）を全て満たす。

11-4. 理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域の受け入れ体制

理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域において、搬送された検体を BSL 2 施設（W-315 室）の施錠のできる-80℃ 冷凍庫（長期間保存の場合）で保管する。検体の搬入、使用、破棄については、理研・検体管理者が管理するログブックにその都度記入する。理化学研究所オミックス基盤研究領域　西棟 W-315 (BSL-2)実験質利用マニュアル(2009 年 7 月 28 日版)に従う。横浜研究所研究倫理委員会に提出し承認された研究計画書「SmartAmp 法及び塩基配列決定によるインフルエンザウイルス同定システムの開発」（横浜 H21-12；2009 年 7 月 31 日承認）に従って、研究を実施する。



11-5. 検体の処理とインフルエンザウイルスのシークエンス解析

理化学研究所オミックス基盤研究領域の「シークエンスに関する手順書」第１版に従って、臨床研究を実施する医療機関から搬送されてきた検体からインフルエンザウイルスのゲノム RNA を抽出・精製して、逆転写(RT)-PCR 等を行った後、塩基配列を解析する（GeNAS に委託)。

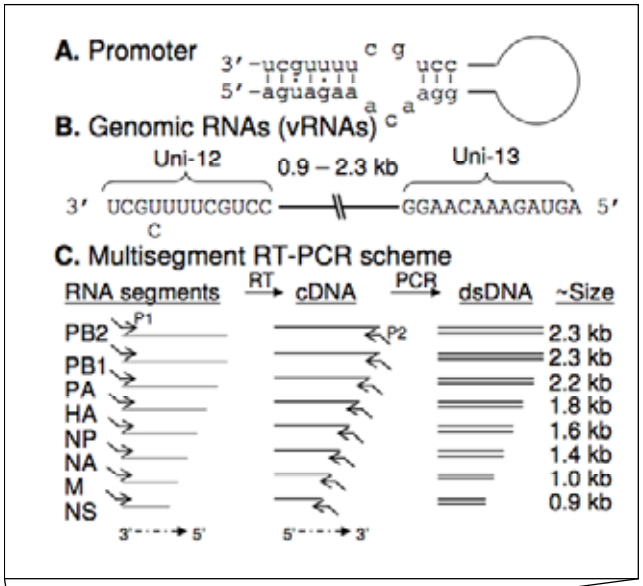
＜ウイルス RNA の抽出・精製＞

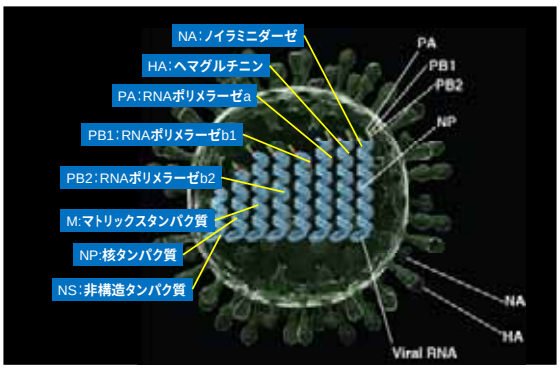
インフルエンザウイルス検体からの感染を防ぐために、ウイルス RNA の抽出・精製は理化学研究所・西棟 W-315 室で行うものとする。「理化学研究所オミックス基盤研究領域　西棟 W-315 (BSL2)実験質利用マニュアル」(2009 年 7 月 28 日版)に従う。横浜研究所研究倫理委員会に提出し承認された研究計画書「SmartAmp 法及び塩基配列決定によるインフルエンザウイルス同定システムの開発」（横浜 H21-12；2009 年 7 月 31 日承認）に従って、以下の研究を実施する。

融解した検体溶液からインフルエンザウイルス RNA を抽出･精製する。その方法は QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit のプロトコールに従う。

抽出･精製したウイルス RNA を保管する際は、W-315 室内の-80ºC 冷凍庫に入れて保管する。そのまま RNA 濃度を測定するときは、W-315 室の Pass-out と記されたパスボックスを通して室外へ出す。RNA 濃度を、「シークエンスに関する手順書」第１版に従って、NanoDrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC 社)を用いて測定する。

＜マルチセグメント RT-PCR＞





インフルエンザウイルスのゲノムは１本鎖 RNA であることから、まず逆転写 (RT) 反応によって RNA から相補的 DNA (cDNA)を生成する。A 型インフルエンザウイルスの RNA ゲノムは 8 分節(HA, NA, PA, PB1, PB2, M, NP, NS)からなり、それぞれの分節は 5’-および 3’-末端に共通シークエンスを持つ[8]。その性質に基づいて、5’-ACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG-3’および 5’-ACGCGTGATCAGTAGAAAGG-3’のプライマーを用いてマルチセグメント RT-PCR を行う[8]。
ターゲットフラグメントの有無を確認するために、RT-PCR 産物のサイズを 1.5%アガロースゲル電気泳動法によって確認する。「シークエンスに関する手順書」第１版に従って、実験を行う。UV 照射しながらルミノ・イメージアナライザーを用いて電気泳動法結果を撮影し、電子ファイルと紙媒体に記録する。

＜分節特異的 PCR＞
HA 分節と NA 分節を数個のフラグメントに分けて PCR で増幅する。その際プライマーの 5’端には T7 または SP６プロモーター配列をつけておく（添付資料２）。PCR の条件は「シークエンスに関する手順書」第１版を参照すること。ターゲットフラグメントの有無を確認するために、PCR 産物のサイズを 1.5%アガロースゲル電気泳動法によって確認する。ターゲットフラグメントの品質をチェックするために、UV 照射しながらルミノ・イメージアナライザーを用いてゲル電気泳動法の結果を撮影し、電子ファイルと紙媒体に記録する。

＜シーケンシング反応と塩基配列測定＞
濃度調製済み PCR 産物を、「シークエンスに関する手順書」第１版に従って、シーケンシング反応にかける。シーケンシング反応後の溶液を MultiScreen-HTS HV でゲル濾過精製する。そうして精製できたサンプル(15 μL)を ABI 3730 xl にかけてシークエンス解析する。
当該研究においては、A 型インフルエンザウイルス RNA ゲノムの 8 分節のうち、HA 分節と NA 分節の解析を優先的に行う。（SmartAmp 法で HA 分節を検出する一方、NA 分節の変異（特に His275Tyr）はタミフル耐性に関係するため。）

＜シークエンス結果の評価＞
RT-PCR および分節特異的 PCR の産物に関して、その品質をチェックするために、UV 照射しながらルミノ・イメージアナライザーを用いてゲル電気泳動法の結果を撮影し、電子ファイルと紙媒体に記録するものとする。特に、分節特異的 PCR の産物はゲル電気泳動法の結果、単一バンドであることを確認し、シーケンシング反応を行う。RT-PCR の産物に関しては、HA, NP, NA, M, NS 分節を確認する。検体におけるウイルスの量が少ない場合、これらの分節をシークエンス解析で確認できない場合がある。その場合には、Roche 社の新型インフルエンザウイルス検出キットを用いた定量的 PCR で、M と HA 分節の有無と量を測定する。

12.　臨床研究の結果

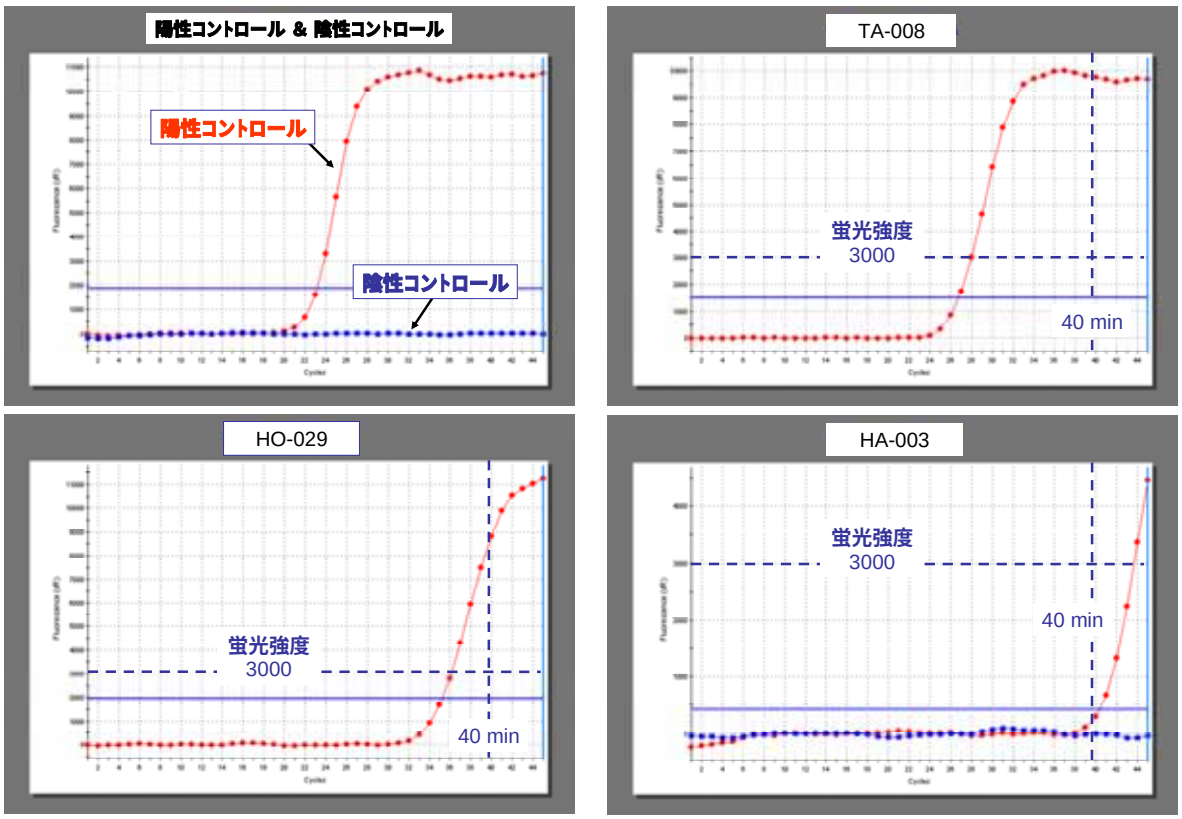
12-1. 検体の採取

千葉県立東金病院と山武郡市の１２の診療所において、平成２１年１０月１３日から１１月２０日の期間で、発熱がありインフルエンザ感染が疑われる患者を対象として、臨床研究を実施した。患者から鼻腔ぬぐい液検体（インフォームドコンセントと連結可能匿名化済み）を採取して、合計１６１検体について免疫クロマト法と SmartAmp 法によって新型および季節性インフルエンザウイルスを検出した。そして免疫クロマト法と SmartAmp 法の結果を比較検討した。添付資料１を参照。

東金病院	35検体
協力診療所	126検体
総数	161検体

12-2. SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出：「陽性」と「陰性」判定基準

Mx3000リアルタイムPCR 装置を用いて、 60℃でSmartAmp反応を進行させて、反応時間40分における蛍光強度が3000を超えた場合、「陽性」と判断し、それより以下は「陰性」と判断した。以下の図に、陽性・陰性コントロールと共に、SmartAmp法によって新型インフルエンザウイルス検出した結果、「陽性」と判断された検体（TA-008とHO-029）および「陰性」と判断した検体（HA-003）の例を示す。



12-3. 免疫クロマトと SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の比較

合計１６１検体（添付資料１）のうち、７８検体は免疫クロマト法で A 型インフルエンザ（季節性または新型）「陽性(+)」と判定された。一方、SmartAmp 法では９４検体が新型インフルエンザ「陽性(+)」と判定された。免疫クロマト法で「陽性(+)」と判定された７８検体 (73 + 5 検体) のうち７３検体は、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性(+)」と判定された。のこり５検体は、免疫クロマト法で A 型インフルエンザ「陽性(+)」と判定されたにも関わらず、SmartAmp 法では新型インフルエンザ「陰性(-)」と判定された。

免疫クロマト	SmartAmp	検体数
A (+)	新型 (+)	73
A (+)	新型 (-)	5
A (-)	新型 (+)	21
A (-)	新型 (-)	62
	合計	161

上記の矛盾点を解明するために、RNA 抽出をしてシークエンス解析と定量的 RT-PCR を行った。その結果、以下の表に示す。

検体番号	免疫クロマト	SmartAmp	備考
NI-001	A (+)	新型(-)	免クロ法とSmartAmp法のサンプルの両方でシークエンスできなかった。 定量的RT-PCRでM分節のレベルが高い事が判明--> H3N2の可能性。
HO-017	A (+)	新型(-)	免クロ法のサンプルでシークエンス解析できた。新型A/H1N1と判明。 SmatAmp法サンプルにウイルスがなかった。定量的RT-PCRでウイルス無しと判明。
MA-028	A (+)	新型(-)	免クロ法のサンプルでシークエンス解析できた。新型A/H1N1と判明。 SmatAmp法サンプル：定量的RT-PCRの結果　HA分節(H1)<1,000 ：検出限界以下
MA-034	A (+)	新型(-)	免クロ法のサンプルでシークエンス解析できた。新型A/H1N1と判明。 SmatAmp法サンプル：定量的RT-PCRの結果　HA分節(H1)<1,000 ：検出限界以下
MA-035	A (+)	新型(-)	免クロ法のサンプルでシークエンス解析できた。新型A/H1N1と判明。 SmatAmp法サンプル：定量的RT-PCRの結果　HA分節(H1)>1,000 ：検出限界以上。

NI-001 検体に関しては、マルチセグメント RT-PCR でウイルスゲノムを増幅する事ができず、シークエンス解析を実施することができなかった。さらに、A 型ウイルスの H1 分節と N1 分節に特異的なプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行ったが、それらの分節をコードする DNA 増幅は確認できなかった。しかしながら M 分節（A 型ウイルスに共通）に特異的なプライマーで定量的 PCR を行ったところ、高レベルの M 分節を検出した。このことから NI-001 検体を提供した患者は A/H1N1 以外の A 型ウイルス（たとえば A/H3N2）に感染していたと考えられる。

HO-017、MA-028、MA-034 の３つの検体に関しては、免疫クロマト用のサンプルでは、十分なウイルス量が確認できて、シークエンス解析を実施することができた。その結果、検体中のインフルエンザウイルスの種類を新型 A/H1N1 と判定した。一方、SmartAmp 用のサンプルにはインフルエンザウイルスが含まれていなかった、またはウイルスレベルが SmartAmp 法の検出限界以下であったことが定量的 RT-PCR によって確認された。したがって SmartAmp 法の結果を裏付ける事ができた。

MA-035 検体に関しては、免疫クロマト用のサンプルでは、十分なウイルス量が確認できて、

シークエンス解析を実施することができた。その結果、検体中のインフルエンザウイルスの種類を新型 A/H1N1 と判定した。SmartAmp 用のサンプルにも、新型インフルエンザウイルスが十分量（H1 分節：5 x 10^5 コピー）含まれていることが定量的 RT-PCR によって確認された。したがって、このデータが SmartAmp 法の結果が偽陰性であった事を示唆する。

12-4. 免疫クロマト「陰性」vs. SmartAmp 法「陽性」の検体と詳細な解析

免疫クロマト法検査で A 型インフルエンザ「陰性」となった８４検体のうち、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」となった検体は合計２１あった（下表を参照）。これらについて詳しく解析するために、免疫クロマト用検体および SmartAmp 用検体の両方から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法とシークエンス解析法で新型 A インフルエンザの有無を検証した。

検体番号	免疫クロマト	SmartAmp	備考
HA-002	A (-)	新型 (+)	定量的RT-PCRで新型HA分節(H1)を検出した。
HU-004	A (-)	新型 (+)	定量的RT-PCRで新型HA分節(H1)とM分節を検出した。
IT-002	A (-)	新型 (+)	定量的RT-PCRで新型HA分節(H1)を検出した。
SA-002	A (-)	新型 (+)	定量的RT-PCRで新型HA分節(H1)を検出した。
SA-008	A (-)	新型 (+)	定量的RT-PCRの結果　HA分節(H1) <1,000。
TO-1006	A (-)	新型 (+)	定量的RT-PCRで新型HA分節(H1)を検出した。
TO-1019	A (-)	新型 (+)	定量的RT-PCRで新型HA分節(H1)を検出した。
HO-001	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型A/H1N1を同定した。
HO-005	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型A/H1N1を同定した。
HO-013①	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型A/H1N1を同定した。
HO-024	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型A/H1N1を同定した。
HO-028	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型A/H1N1を同定した。
TA-008	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型A/H1N1を同定した。
TO-1004	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型A/H1N1を同定した。
SA-010	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型NA分節(N1)を同定した。
HO-004(再)	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型A/H1N1を同定した。
HO-015②	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型A/H1N1を同定した。
HI-024	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型HA分節(H1)を同定した。
HI-025	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析で新型HA分節(H1)を同定した。
IT-025	A (-)	新型 (+)	定量的RT-PCRで新型HA分節(H1)を検出できず。
MA-032	A (-)	新型 (+)	定量的RT-PCRで新型HA分節(H1)を検出した。

SA-008 と IT-025 を除いて１９検体全てで定量的 RT-PCR またはシークエンス解析によって、新型 A/H1N1 または HA 分節 (H1)を同定することができた。したがってそれら１９検体に関しては、SmartAmp 法で「陽性」を裏付ける事ができた。

一方、　SA-008 と IT-025 の２つの SmartAmp 用検体においては、SmartAmp 法の検出限界（H1 分節が 1,000 コピー）よりも大幅に下回っていることが定量的 RT-PCR によって明らかになった。このことは、SmartAmp 法の結果が偽陽性であった可能性、またはウイルス RNA 抽出の効率が不十分であった可能性を示唆する。

12-5. SmartAmp 法「陽性」と臨床データとの関連づけ

免疫クロマト法で「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判断されたのは２１症例あった。ケースカードに記述されていた検体番号と臨床データを連結させて検討をおこなった。その結果を以下の表に示す。

検体番号	免疫クロマト	SmartAmp	性別･年齢	同意書･診療日時	診察時体温	発熱開始日時	発熱後時間
IT-025	A（－）	新型（＋）	男･16	11/20 12:00	36.6	11/20 11:00:00	1時間
TO-1004	A（－）	新型（＋）	女･9	10/15 9:40	37.7	10/15 6:00:00	3時間
HA-002	A（－）	新型（＋）	女･19	10/19 15:28	37.5	10/19 10:00:00	5時間
SA-010	A（－）	新型（＋）	男･21	10/28 11:30	38.1	10/28 6:00:00	5時間
HO-024	A（－）	新型（＋）	女･55	10/26 17:25	38.8	10/26 9:00:00	8時間
TA-008	A（－）	新型（＋）	男･31	10/28 17:25	37.4	10/28 8:00:00	9時間
TO-1019	A（－）	新型（＋）	男･22	10/28 15:40	37.8	10/28 6:00:00	9時間
HO-028	A（－）	新型（＋）	男･11	10/28 16:35	38.4	10/28 6:00:00	10時間
HO-013	A（－）	新型（＋）	女･39	10/22 10:30	37.3	10/21 22:00:00	12時間
TO-1006	A（－）	新型（＋）	男･53	10/19 2:15	41.2	10/18 13:00:00	13時間
SA-002	A（－）	新型（＋）	男･16	10/20 10:05	38.1	10/19 20:00:00	14時間
IT-002	A（－）	新型（＋）	男･76	10/13 11:20	37.8	10/12 20:00:00	15時間
MA-032	A（－）	新型（＋）	男･14	11/19 10:30	38.6	11/19 19:00:00	15時間
HI-025	A（－）	新型（＋）	男･19	11/17 10:50	37.3	11/16 19:00:00	15時間
HO-001	A（－）	新型（＋）	男･11	10/19 9:45	38.2	10/18 15:00:00	18時間
HO-005	A（－）	新型（＋）	女･16	10/19 16:00	39.7	10/18 20:00:00	20時間
SA-008	A（－）	新型（＋）	男･22	10/27 15:10	37	10/26 18:00:00	21時間
HO-015	A（－）	新型（＋）	男･40	10/22 11:56	38.5	10/21 8:00:00	27時間
HU-004	A（－）	新型（＋）	女･9	10/26 11:50	36.8	10/25 6:00:00	29時間
HO-004	A（－）	新型（＋）	女･10	10/19 15:45	38.1	10/17 7:00:00	56時間
HI-024	A（－）	新型（＋）	男･6	11/16 15:30	37.8	11/13	72時間

年齢の低い患者が多いことが顕著である。４検体（HO-015, HU-004, HO-004, HI-024）を除いて、全ての症例で発熱開始から 24 時間以内に、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定された。特に検体 IT-025, TO-1004, HA-002, SA-010 においては、発熱開始後 5 時間以内の時点で既に、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定されている。このことは、ウイルス感染後早期の段階でも SmartAmp 法で新型インフルエンザを検出することができることを示す。

12-6. 症例報告

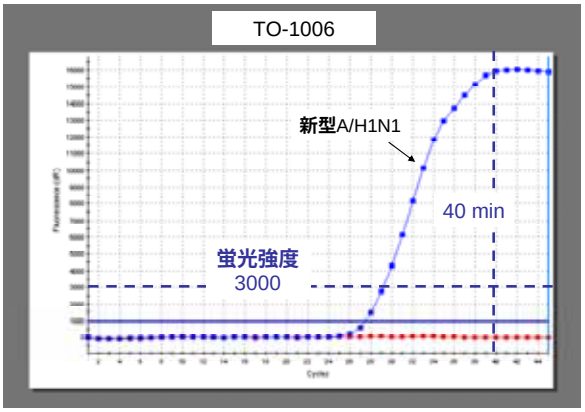
＜症例１：TO-1006＞SmartAmp 法で救命できた例

前立腺肥大の男性で、前立腺生検の直後から発熱した。通常は、尿路からの細菌感染を疑うケースであるが、念のため免疫クロマト法と SmartAmp 法を実施した。

その結果、免疫クロマト法では「陰性」であったが、SmartAmp 法では「陽性」（右図）と判定された。

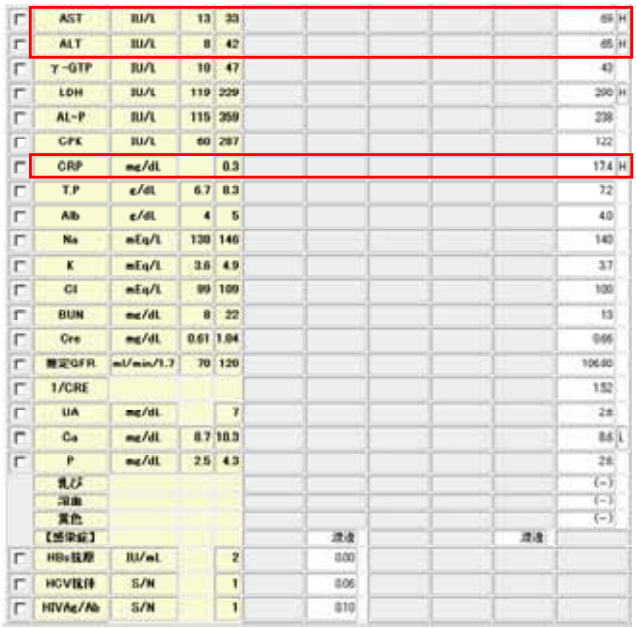
SmartAmp 法の結果をうけて、タミフルを投与した。一時肺炎の兆候が見られたが、その後の経過は良好となった。

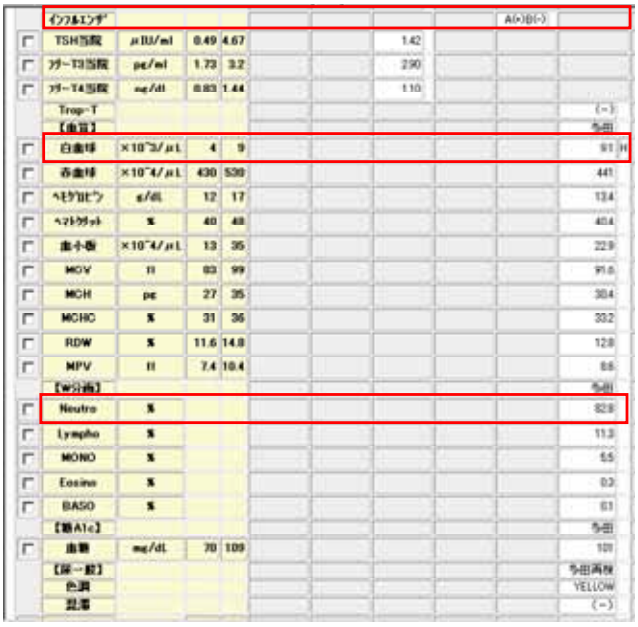
この症例は、SmartAmp 法で早期に新型インフルエンザウイルスを検出できて、患者が助かった例である。



＜症例２：TO-1020＞タミフル耐性を示した例

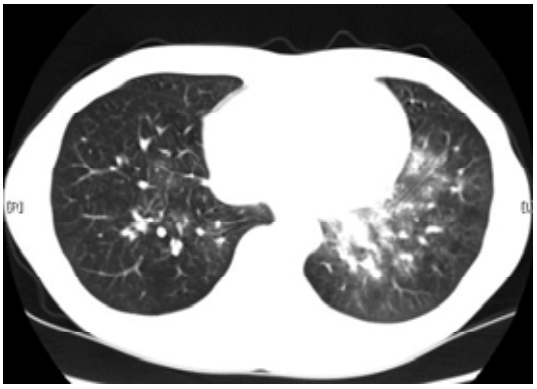
30 歳の男性で、他の病院で５日前に免疫クロマト法で A 型インフルエンザと診断されて、タミフルを内服するも高熱が続き、肺炎になって千葉県立東金病院に入院した。臨床検査データは、CRP 高値、肝機能異常、インフルエンザ A 型、白血球数の増加を顕著に示した。肺炎球菌肺炎も併発し、尿中抗原陽性であった。





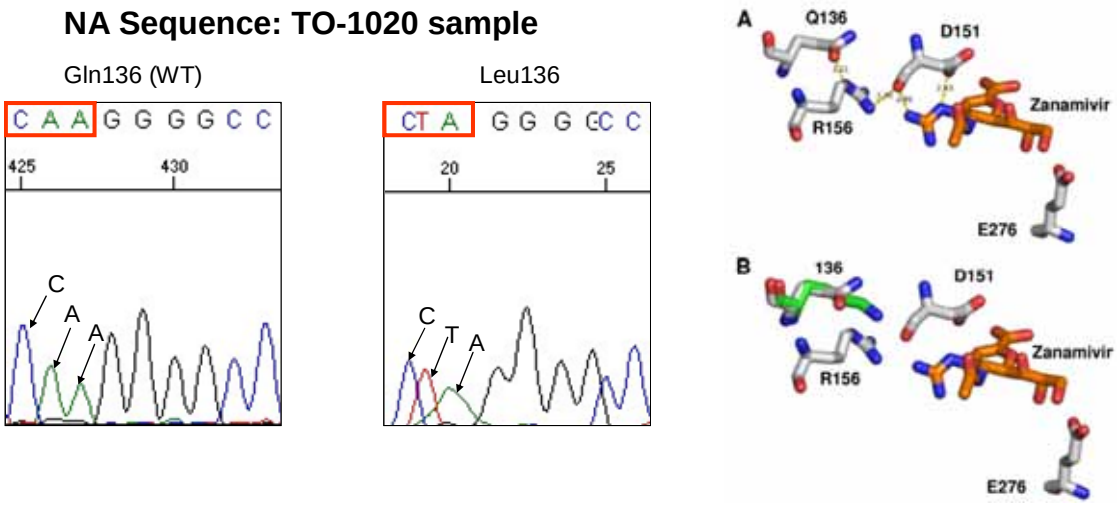
千葉県立東金病院にて、その患者から Swab 検体を採取して SmartAmp 法で調べた結果、新型インフルエンザウイルス A/H1N1 が検出された（SmartAmp 法：陽性）。

胸部 CT 画像は、左中肺野に広範なびまん性の浸潤影を示し、ウイルス性肺炎が示唆された。



タミフル耐性の新型インフルエンザウイルス A/H1N1 の可能性が示唆されたので、TO-1020 検体から RNA を抽出し、マルチセグメント RT-PCR を行った。そして NA 分節の塩基配列を解析した。その結果、275 番目のアミノ酸は His であり、タミフル耐性のウイルスではな事がわかった。しかし、一方 136 番目のアミノ酸が Gln から Leu に変異する塩基配列が得られた。136 番目のアミノ酸が Gln(Q)から Lys (K)に変異すると、季節性インフルエンザウイルス A/H1N1 がリレンザ(Zanamivir)に対して耐性になることが最近報告された [9]。X 線結晶構造解析に基づいて、リレンザを結合する部位の水素結合が変異によって失われた場合、リレンザへの親和性は低下すると考えられている [9]。

そのために、TO-1020 検体の再度慎重にシークエンス解析を行ったが、Gln136(WT)の塩基配列しか得られなかった。患者の体内で、変異型と野生型の両方が共存していた可能性もありうる。そのために TO-1020 検体からウイルスを培養単離することを試みた。

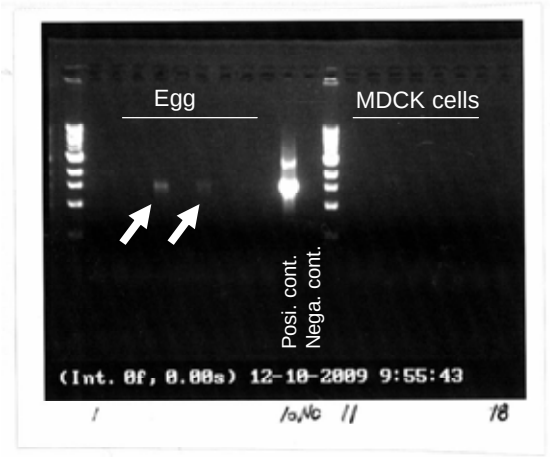


TO-1020 検体からインフルエンザウイルスを分離する試み

大阪大学・微生物病研究所　感染症国際研究センター　高病原性感染症研究部門ウイルス研究グループの中屋隆明先生および大道寺智先生に、TO-1020検体（免疫クロマト用検体）からインフルエンザウイルスを分離する事をお願いした。

発育鶏卵もしくは細胞 (ヒト呼吸器上皮細胞株ならびにMDCK)を用いてウイルス分離を試みた。MDCK細胞（インフルエンザウイルス感受性細胞株）と発育鶏卵に、臨床試料を接種することから開始した（プロトコールはWHO等のものに準ずる）。
数日培養後、
・培養液（MDCK細胞）1代目
・しょう尿液（発育鶏卵）1代目
を回収し、
１）RT-PCR解析
２）上記液をMDCK細胞にかけ、翌日抗インフルエンザ抗体でウイルスタンパク質の発現の有無を蛍光抗体法（IFA法）にて評価した。

発育鶏卵(感染4日後) のallantoic fluid（しょう尿液）、細胞 (感染5日後) のsupからそれぞれRNA抽出しone stepのRT-PCRでNP分節をコードする遺伝子を増幅した。
一部のegg由来サンプルで色のうすいバンド（矢印）が検出されておりウイルスが分離されている可能性が示唆された。



NP**全長を増幅**

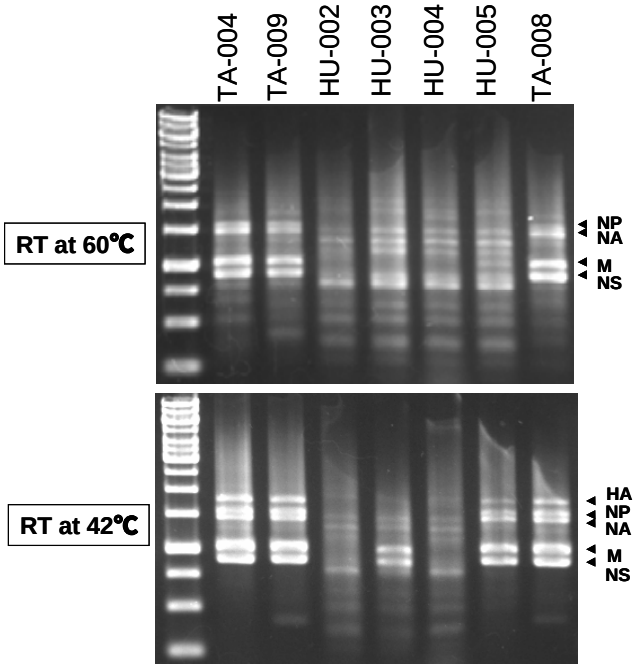
1-9: egg isolated virus
10: e1269 (positive control)
NC: negative control
11-18: cell isolated virus

しかし、最初にinjectionしたサンプルの持ち込みの可能性が否定できないので、RT-PCRでバンドが検出されたしょう尿液を用いてMDCK細胞に感染させた。感染24時間後ホルマリン固定し、immunofluorescence assay (IFA) を行ったが、今回のサンプルでは染色されなかった。1代目の液中にウイルスゲノムは少量存在するが、それが感染し新たにウイルスタンパク質を産生した形跡がなかった。RT-PCRで検出したウイルスバンド(矢印)は臨床検体から持ち込まれたゲノム断片である可能性が高い。しかしながら、感染力をもったウイルスがごく少量増殖している可能性を完全に否定できないことから、再度、しょう尿液（1代目）発育鶏卵に接種し、2代目のしょう尿液を回収後、同じくRT-PCR, IFA試験を行ったが、その結果はマイナス（ネガティブ）であった。したがって、免疫クロマト用検体中にはウイルスゲノムは存在したが、界面活性剤の影響でウイルスは感染性を失っていたと結論づけられた。

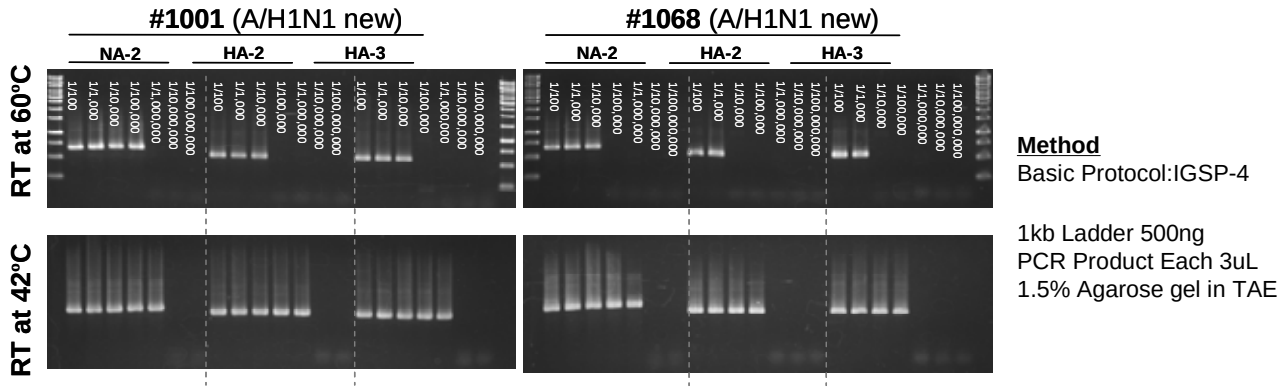
12-7. シークエンス解析の結果と方法の改良

本研究において、我々は Swab 検体から RNA を抽出し、マルチセグメント RT-PCR[8]を行った。その DNA 産物を鋳型として分節特異的な PCR を実施した(添付資料２と添付資料３)。そして H1 分節と NA 分節の塩基配列を解析した。その際、マルチセグメント RT-PCR の条件が、シークエンス解析の感度を決めるうえで極めて重要であることが判明した。

本研究では、ウイルスゲノム RNA の高次構造をほどくため、マルチセグメント RT-PCR のうち RT（逆転写反応）の温度を 60ºC としたが、その条件ではインフルエンザウイルス RNA を効率的に cDNA に逆転写できなかった。その感度は SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルスの検出感度よりも劣る事が判明した。事実、検体中のウイルス濃度が低い場合、SmartAmp 法で新型インフルエンザウイルスを検出できても、マルチセグメント RT-PCR の感度が不十分であるため、シークエンス解析を実施できないケースがあった。そのために、RT の温度を 42ºC に下げて、マルチセグメント RT-PCR を実施した（右図を参照)。すると、HA, NP, NA, M, NS 分節が確認できるようになった。

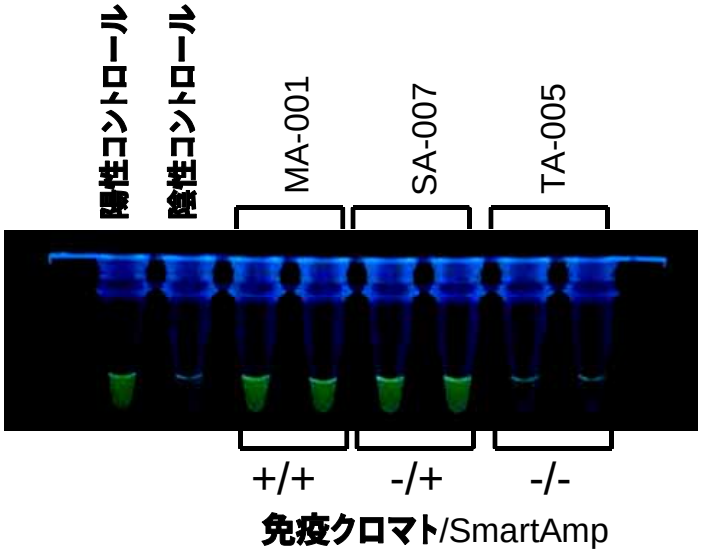


さらに、単離培養した新型インフルエンザウイルス（横浜市衛生研究所より提供）を用いて、感度試験を行った（下図)。ウイルスを段階的に希釈したサンプルを基に、マルチセグメント RT-PCR を行い、次いで分節特異的 PCR を実施した。その結果、RT の温度を 60ºC から 42ºC に下げることにより、感度が約 100 倍向上した。今後、この新しい条件でシークエンス解析を行う事が望ましい。



12-8. SmartAmp 法による新型 A インフルエンザウイルスの目視測定の可能性

本臨床研究においては、SmartAmp 法による新型 A インフルエンザウイルスの検出を目視で行う試行も実施した。以下の図に示すように良好な結果が得られた。



また、小型化された目視装置の試作もおこなった（バイオテック株式会社との共同）。SmartAmp 反応をその装置内 60ºC で実施して、その結果を実際に目で観察して確認することが可能になった。今後、この装置の有用性を７か所の診療所で検証する予定である。

13. 考察

本臨床研究を始めるにあたって、横浜市衛生研究所より提供のあった単離培養した新型 A インフルエンザウイルス株に対して、その HA 分節を検出するプライマーを用いた SmartAmp 法は、検出感度において免疫クロマトよりも有意に高い感度を持つことが明らかになった。さらに、新型 A インフルエンザウイルスの HA 分節を検出するプライマーは、季節性 A/H1N1、季節性 A/H3N2、B 型 (Yakagata) には交差せず、新型インフルエンザウイルス ”2009 pandemic influenza A/H1N1virus “に対して極めて特異性が高い。

一方、鼻腔ぬぐい液検体中には、反応を阻害する物質（タンパク質）が混在しており、直接的に RT-SmartAmp 反応を行うことはできなかった。そのために、阻害物質を取り除く前処理が必要不可欠であることが判明した。前処理カラムを使うことにより、阻害物質とウイルス RNA を分離することが可能になった。

合計１６１検体のうち、７３検体は免疫クロマト法と SmartAmp 法で共に「陽性」と判定された。また６２検体は、免疫クロマト法と SmartAmp 法で共に「陰性」と判定された。一方、免疫クロマト法で「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定された検体は２１。免疫クロマト法で「陽性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陰性」と判定されたのは５検体あった。ウイルスゲノムの塩基配列解析および定量的 RT-PCR によって SmartAmp 法の結果を検証して、その結果の裏付けをとった。その結果、１検体において SmartAmp 結果が偽陰性、２検体において SmartAmp 結果が偽陽性またはウイルス RNA の抽出が不良であったことが示唆された。

免疫クロマト法で「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定された症例について、患者の症状（体温）と臨床データ（発熱からの時間）を連結させて検討をおこなった。その結果、発熱から来院までの時間は症例にごとに異なるが、早い場合、発熱から数時間で新型 A インフルエンザウイルスを SmartAmp 法で検出できることが明らかになった。したがって SmartAmp 法は、免疫クロマト法と比較して新型インフルエンザウイルス(A/H1N1)を感度良く検出できると結論づけられた。

さらに、高価なリアルタイム PCR 装置（Mx3000 等）を使わなくても、条件を最適化することによって SmartAmp 法による新型Ａインフルエンザウイルスの検出を目視で行うことが可能になる足掛かりをえた。今後、地域の診療所でも SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出を実施するには、目視法の確立と小型装置の開発は極めて重要であろう。

14. 謝　辞

本臨床研究を実施するにあたり、ご協力を頂いた方々に心より感謝申し上げます。
天野豊先生（天野内科クリニック）、伊藤俊夫先生（伊藤医院）、岡崎信彦先生（岡崎医院）、金子昇先生（松尾クリニック）、加部恒雄先生（山武市日向診療所）、佐久間猛先生（佐久間医院）、佐藤成信先生（北辰堂佐藤医院）、高橋一先生（高橋医院）、田畑陽一郎先生（医療法人明生会）、西田泉先生（西田医院）、埴谷一夫先生（はにや内科）、古川洋一郎先生（古川クリニック）、今村茂樹先生（千葉県立東金病院　内科副部長）、古垣斉拡先生（千葉県立東金病院　内科医長）、　鶴岡成一先生（千葉県立東金病院　臨床検査科長）、外口徳美致先生（千葉県立東金病院　地域医療連携室）。

15. 参考文献

1. Neumann G, Noda T & Kawaoka Y (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature 459(7249): 931-939.
2. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM. (2009) Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 360(25):2605-2615.. Erratum in: *N Engl J Med.* 2009 361(1):102.
3. Krug RM & Aramini JM (2009) Emerging antiviral targets for influenza A virus. *Cell* 30(6): 269-277.
4. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y. (2009) In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*. 460(7258):1021-1025.
5. Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, Wadford DA, Pappas C, Zeng H, Gustin KM, Pearce MB, Viswanathan K, Shriver ZH, Raman R, Cox NJ, Sasisekharan R, Katz JM, Tumpey TM. (2009) Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science*. 325(5939):484-487.
6. Mitani, Y., Lezhava, A., Kawai, Y., Kikuchi, T., Oguchi-Katayama, A., Kogo, Y., Itoh, M., Miyagi, T., Takakura, H., Hoshi, K., *et al.* (2007) Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nat. Methods* 4(3), 257-262.
7. Mitani Y, Lezhava A, Sakurai A, Horikawa A, Nagakura M, Hayashizaki Y, and Ishikawa T. A rapid and cost-effective SNP detection method: Application of SmartAmp2 to pharmacogenomics research.

(2009) *Pharmacogenomics* 10(7): 1187-1197.

8. Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, St George K, Hatta M, Kawaoka Y, Wentworth DE. (2009) Single Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J. Virol.* 83(19):10309-10313.
9. Hurt AC, Holien JK, Parker M, Kelso A, Barr IG (2009) Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel meuraminidase mutation. *J. Virol.* 83(20):10366-10373.

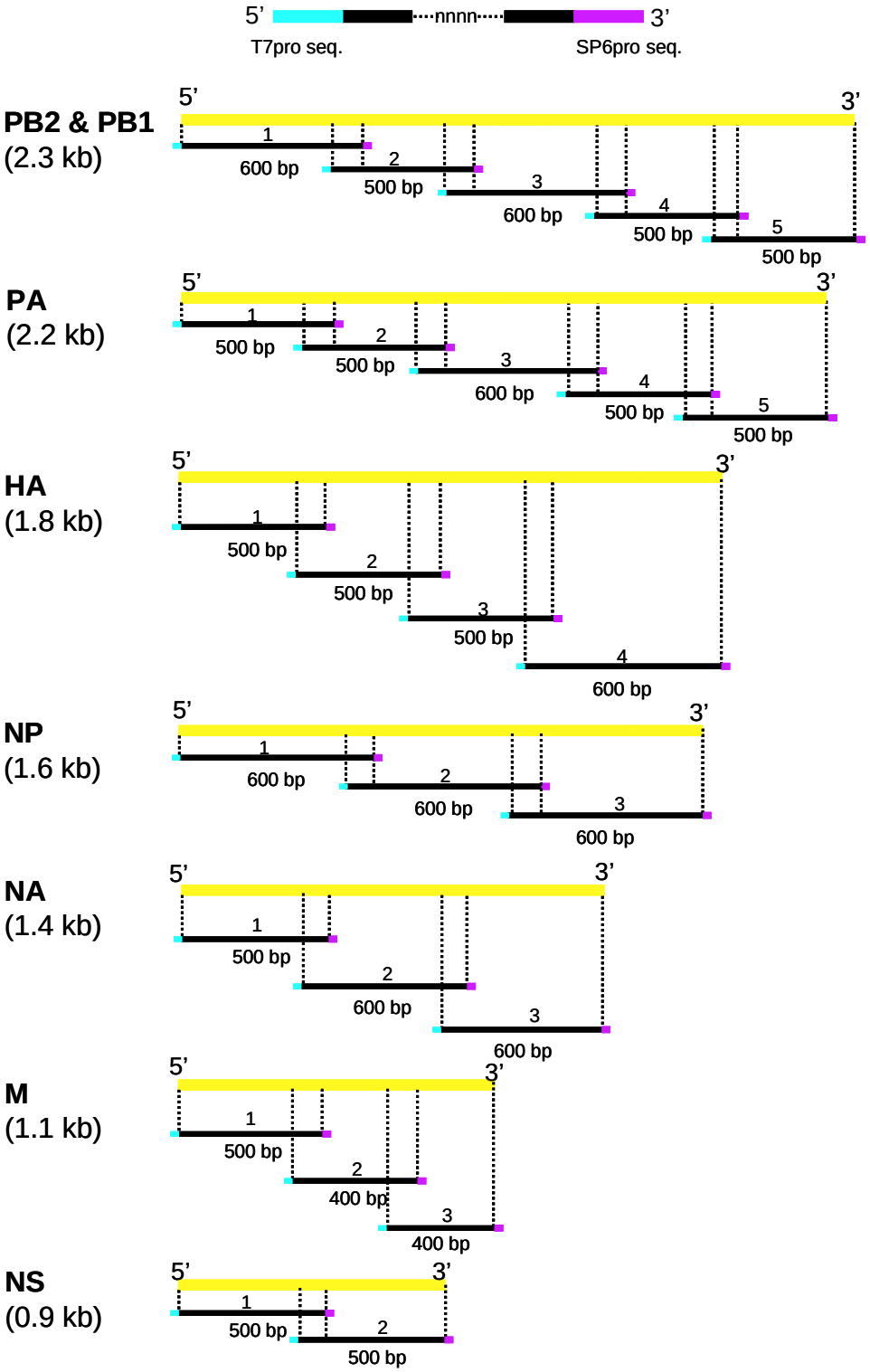
添付資料１：　臨床研究の結果一覧

検体番号	免疫クロマ	SmartAmp	性別･年齢	施設名	同意書･診療日時	診察時体温	発熱後時間
HI-032	A（＋）	新型（＋）	男･11	日向診療所	11/19　16:00	38.9	1時間
IT-008	A（＋）	新型（＋）	女･14	伊藤医院	10/16　8:25	38.9	1時間
HO-022	A（＋）	新型（＋）	男･13	北辰堂	10/26　11:20	38.6	2時間
MA-022	A（＋）	新型（＋）	女･11	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/17　8:20	38.2	2時間
HI-029	A（＋）	新型（＋）	男･12	日向診療所	11/19　9:40	38.8	2時間
HI-030	A（＋）	新型（＋）	女･16	日向診療所	11/19　10:00	38.5	3時間
HI-034	A（＋）	新型（＋）	男･13	日向診療所	11/20　11:00	37.3	3時間
HU-002	A（＋）	新型（＋）	女･4	古川ｸﾘﾆｯｸ	10/22　11:00	39.8	3時間
HU-005	A（＋）	新型（＋）	男･18	古川ｸﾘﾆｯｸ	10/26　16:00	39	3時間
SA-001	A（＋）	新型（＋）	女･21	佐久間医院	10/20　9:10	38.3	3時間
AM-002	A（＋）	新型（＋）	男･10	天野内科	10/26　9:40	37.7	3時間
NI-021	A（＋）	新型（＋）	男･21	西田医院	11/17　12:10	38.5	5時間
MA-005	A（＋）	新型（＋）	女･17	松尾ｸﾘﾆｯｸ	10/14　17:25	37.6	5時間
MA-006	A（＋）	新型（＋）	女･15	松尾ｸﾘﾆｯｸ	10/15　16:10	38.7	6時間
OK-002	A（＋）	新型（＋）	女･8	岡崎医院	10/27　8:50	39.2	6時間
HU-006	A（＋）	新型（＋）	女･38	古川ｸﾘﾆｯｸ	10/27　17:00	38.9	11時間
TO-1005	A（＋）	新型（＋）	男･28	東金病院	10/18　18:40	38.5	11時間
SA-011	A（＋）	新型（＋）	女･40	佐久間医院	10/28　12:00	37.9	12時間
TO-1010	A（＋）	新型（＋）	男･21	東金病院	10/20　10:00	37.6	13時間
MA-029	A（＋）	新型（＋）	男･13	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/19　9:10	39.1	13時間
HO-009	A（＋）	新型（＋）	女･37	北辰堂	10/21　9:50	37.7	13時間
HI-028	A（＋）	新型（＋）	女･11	日向診療所	11/18　10:00	37.4	14時間
HA-005	A（＋）	新型（＋）	女･20	はにや内科	10/22　10:10	38.2	14時間
HA-014	A（＋）	新型（＋）	男･10	はにや内科	10/30　9:30	38.7	14時間
IT-004	A（＋）	新型（＋）	男･46	伊藤医院	10/14　9:30	37.9	14時間
HA-001	A（＋）	新型（＋）	男･10	はにや内科	10/19　9:00	38.5	15時間
TA-004	A（＋）	新型（＋）	男･15	高橋医院	10/23　12:10	37.9	15時間
HA-006	A（＋）	新型（＋）	女･24	はにや内科	10/22　10:25	38	15時間
TO-1018	A（＋）	新型（＋）	女･8	東金病院	10/23　10:30	39	15時間
HI-002	A（＋）	新型（＋）	女･46	日向診療所	10/14　9:40	37.6	15時間
IT-021	A（＋）	新型（＋）	男･7	伊藤医院	11/16　10:50	37.3	15時間
IT-005	A（＋）	新型（＋）	男･14	伊藤医院	10/14　10:00	37.4	16時間
MA-031	A（＋）	新型（＋）	男･4	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/19　10:10	38.5	16時間
HO-020	A（＋）	新型（＋）	女･17	北辰堂	10/26　9:15	38.9	16時間
HI-033	A（＋）	新型（＋）	男･16	日向診療所	11/20　9:20	40.4	16時間
MA-030	A（＋）	新型（＋）	女･11	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/19　9:40	38.1	16時間
HU-003	A（＋）	新型（＋）	女･16	古川ｸﾘﾆｯｸ	10/22　11:10	39	17時間
MA-001	A（＋）	新型（＋）	女･33	松尾ｸﾘﾆｯｸ	10/13　9:30	38.4	17時間
TO-1030	A（＋）	新型（＋）	女･32	東金病院	11/11　14:00	37.9	18時間
IT-023	A（＋）	新型（＋）	女･27	伊藤医院	11/17　10:05	37.1	18時間
IT-024	A（＋）	新型（＋）	女･28	伊藤医院	11/19　10:10	38.6	19時間
MA-023	A（＋）	新型（＋）	男･16	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/17　9:10	38.9	19時間
HO-014	A（＋）	新型（＋）	女･35	北辰堂	10/22　11:05	37.5	20時間
HO-023	A（＋）	新型（＋）	女･12	北辰堂	10/26　12:25	38.8	20時間
MA-024	A（＋）	新型（＋）	女･10	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/17　10:05	38.6	21時間
HA-011	A（＋）	新型（＋）	女･14	はにや内科	10/26　16:40	38.8	21時間
HU-001	A（＋）	新型（＋）	男･15	古川ｸﾘﾆｯｸ	10/19　15:40	39.2	21時間
HA-004	A（＋）	新型（＋）	男･20	はにや内科	10/20　10:00	38.7	22時間
MA-025	A（＋）	新型（＋）	女･42	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/17　11:10	38.6	22時間
HO-029	A（＋）	新型（＋）	男･37	北辰堂	10/29　15:45	37.5	22時間
HI-027	A（＋）	新型（＋）	男･11	日向診療所	11/18　10:00	38.4	23時間
HO-002	A（＋）	新型（＋）	女･11	北辰堂	10/19　11:48	38	23時間
TO-1001	A（＋）	新型（＋）	女･32	東金病院	10/14　14:00	38.6	24時間

HI-001	A（＋）	新型（＋）	男・18	日向診療所	10/13 10:15	38.7	24時間
OK-001	A（＋）	新型（＋）	男・14	岡崎医院	10/20 10:15	39.2	24時間
TA-009	A（＋）	新型（＋）	女・36	高橋医院	10/29 8:45	36.9	24時間
HO-006	A（＋）	新型（＋）	女・29	北辰堂	10/20 11:00	39	25時間
HO-007	A（＋）	新型（＋）	男・16	北辰堂	10/20 12:20	37.4	25時間
TO-1012	A（＋）	新型（＋）	女・19	東金病院	10/21 10:20	38	25時間
MA-004	A（＋）	新型（＋）	女・28	松尾ｸﾘﾆｯｸ	10/14 15:30	38.1	25時間
TA-001	A（＋）	新型（＋）	女・18	高橋医院	10/19 17:05	37	26時間
HA-010	A（＋）	新型（＋）	女・11	はにや内科	10/26 12:25	38.5	29時間
HO-025	A（＋）	新型（＋）	女・21	北辰堂	10/27 18:00	37.8	30時間
MA-027	A（＋）	新型（＋）	女・18	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/18 17:50	38.4	31時間
TO-1003	A（＋）	新型（＋）	女・42	東金病院	10/15 9:00	38	33時間
HI-022	A（＋）	新型（＋）	男・17	日向診療所	11/16 10:30	39.3	34時間
HI-023	A（＋）	新型（＋）	男・12	日向診療所	11/16 10:30	39.5	34時間
IT-007	A（＋）	新型（＋）	女・17	伊藤医院	10/15 10:55	39.1	39時間
HI-021	A（＋）	新型（＋）	女・11	日向診療所	11/16 9:40	38	41時間
MA-026	A（＋）	新型（＋）	女・12	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/17 15:40	36.5	45時間
AM-001	A（＋）	新型（＋）	女・16	天野内科	10/26 9:05	37.5	72時間
TO-1013	A（＋）	新型（＋）	男・33	東金病院	10/21 15:00	36.9	72時間
TO-1020	A（＋）	新型（＋）	男・39	東金病院	10/29 14:05	38	125時間
IT-025	A（－）	新型（＋）	男・16	伊藤医院	11/20 12:00	36.6	1時間
TO-1004	A（－）	新型（＋）	女・9	東金病院	10/15 9:40	37.7	3時間
HA-002	A（－）	新型（＋）	女・19	はにや内科	10/19 15:28	37.5	5時間
SA-010	A（－）	新型（＋）	男・21	佐久間医院	10/28 11:30	38.1	5時間
HO-024	A（－）	新型（＋）	女・55	北辰堂	10/26 17:25	38.8	8時間
TA-008	A（－）	新型（＋）	男・31	高橋医院	10/28 17:25	37.4	9時間
TO-1019	A（－）	新型（＋）	男・22	東金病院	10/28 15:40	37.8	9時間
HO-028	A（－）	新型（＋）	男・11	北辰堂	10/28 16:35	38.4	10時間
HO-013	A（－）	新型（＋）	女・39	北辰堂	10/22 10:30	37.3	12時間
TO-1006	A（－）	新型（＋）	男・53	東金病院	10/19 2:15	41.2	13時間
SA-002	A（－）	新型（＋）	男・16	佐久間医院	10/20 10:05	38.1	14時間
IT-002	A（－）	新型（＋）	男・76	伊藤医院	10/13 11:20	37.8	15時間
MA-032	A（－）	新型（＋）	男・14	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/19 10:30	38.6	15時間
HI-025	A（－）	新型（＋）	男・19	日向診療所	11/17 10:50	37.3	15時間
HO-001	A（－）	新型（＋）	男・11	北辰堂	10/19 9:45	38.2	18時間
HO-005	A（－）	新型（＋）	女・16	北辰堂	10/19 16:00	39.7	20時間
SA-008	A（－）	新型（＋）	男・22	佐久間医院	10/27 15:10	37	21時間
HO-015	A（－）	新型（＋）	男・40	北辰堂	10/22 11:56	38.5	27時間
HU-004	A（－）	新型（＋）	女・9	古川ｸﾘﾆｯｸ	10/26 11:50	36.8	29時間
HO-004	A（－）	新型（＋）	女・10	北辰堂	10/19 15:45	38.1	56時間
HI-024	A（－）	新型（＋）	男・6	日向診療所	11/16 15:30	37.8	72時間
MA-028	A（＋）	新型（－）	男・12	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/18 17:45	38.2	0時間
MA-034	A（＋）	新型（－）	男・11	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/19 17:35	36	10時間
HO-017	A（＋）	新型（－）	男・41	北辰堂	10/22 16:45	37.7	17時間
MA-035	A（＋）	新型（－）	男・11	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/20 10:55	37.5	20時間
NI-001	A（＋）	新型（－）	男・27	西田医院	10/13 18:45	37.2	24時間
TA-007	A（－）	新型（－）	男・10	高橋医院	10/27 17:00	39.6	1時間
HO-011	A（－）	新型（－）	女・10	北辰堂	10/21 16:30	38	1時間
HO-026	A（－）	新型（－）	女・28	北辰堂	10/28 11:40	37.9	1時間
SA-006	A（－）	新型（－）	女・15	佐久間医院	10/23 11:00	37.3	2時間
TA-003	A（－）	新型（－）	女・1	高橋医院	10/23 9:20	38.8	2時間
TO-1007	A（－）	新型（－）	男・18	東金病院	10/18 16:00	38.5	3時間
IT-009	A（－）	新型（－）	男・8	伊藤医院	10/16 9:40	37.3	3時間
IT-001	A（－）	新型（－）	女・19	伊藤医院	10/14 9:30	38	3時間

TO-1027	A（－）	新型（－）	女・90	東金病院	11/6 15:30	37.5	4時間
TO-1029	A（－）	新型（－）	男・39	東金病院	11/10 23:30	39.9	4時間
TO-1032	A（－）	新型（－）	女・22	東金病院	11/12 11:50	39.2	4時間
HA-008	A（－）	新型（－）	女・17	はにや内科	10/22 14:00	38.5	5時間
HO-012	A（－）	新型（－）	男・5	北辰堂	10/21 18:00	37.7	5時間
HO-016	A（－）	新型（－）	女・52	北辰堂	10/22 16:30	39.1	5時間
TO-1011	A（－）	新型（－）	男・11	東金	10/20 15:30	38.9	5時間
HA-007	A（－）	新型（－）	女・24	はにや内科	10/22 12:55	37	6時間
MA-002	A（－）	新型（－）	女・18	松尾ｸﾘﾆｯｸ	10/13 15:10	37.6	8時間
HA-013	A（－）	新型（－）	男・35	はにや内科	10/29 11:15	37.8	8時間
HA-009	A（－）	新型（－）	男・12	はにや内科	10/22 16:30	38.9	8時間
TO-1014	A（－）	新型（－）	女・62	東金病院	10/21 18:30	38.1	8時間
HO-027	A（－）	新型（－）	女・7	北辰堂	10/28 16:10	38.7	9時間
TO-1028	A（－）	新型（－）	男・37	東金病院	11/10 17:17	37.8	10時間
HA-003	A（－）	新型（－）	男・26	はにや内科	10/19 16:10	37	11時間
TO-1026	A（－）	新型（－）	男・66	東金病院	11/15 10:25	37.5	12時間
MA-033	A（－）	新型（－）	女・17	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/19 10:30	36.2	12時間
HI-003	A（－）	新型（－）	男・23	日向診療所	10/14 10:50	38	12時間
TO-1033	A（－）	新型（－）	男・70	東金病院	11/16 10:00	37.7	13時間
HI-031	A（－）	新型（－）	女・5	日向診療所	11/19 15:30	38	13時間
TA-005	A（－）	新型（－）	男・26	高橋医院	10/27 9:30		13時間
HI-026	A（－）	新型（－）	女・23	日向診療所	11/17 11:00	38	14時間
MA-003	A（－）	新型（－）	女・37	松尾ｸﾘﾆｯｸ	10/14 12:10	37.9	14時間
IT-003	A（－）	新型（－）	女・9	伊藤医院	10/14 9:30	37.3	14時間
SA-009	A（－）	新型（－）	女・51	佐久間医院	10/28 10:40	37.3	14時間
IT-006	A（－）	新型（－）	男・25	伊藤医院	10/14 10:45	38	14時間
HO-019	A（－）	新型（－）	女・15	北辰堂	10/23 10:55	39.3	14時間
TO-1031	A（－）	新型（－）	男・28	東金病院	11/12 10:30	40	15時間
TA-002	A（－）	新型（－）	男・8	高橋医院	10/20 9:35	37.9	15時間
IT-022	A（－）	新型（－）	男・4	伊藤医院	11/16 11:45	37.6	15時間
TO-1016	A（－）	新型（－）	男・70	東金病院	10/22 18:10	41	16時間
HA-012	A（－）	新型（－）	女・41	はにや内科	10/26 17:00	38.4	17時間
TO-1025	A（－）	新型（－）	男・13	東金病院	11/5 10:00	38.4	17時間
TO-1009	A（－）	新型（－）	男・69	東金病院	10/20 9:51	38	17時間
HU-007	A（－）	新型（－）	男・13	古川ｸﾘﾆｯｸ	10/28 11:45	38.5	18時間
MA-021	A（－）	新型（－）	女・12	松尾ｸﾘﾆｯｸ	11/16 12:20	38.6	18時間
MA-007	A（－）	新型（－）	男・43	松尾ｸﾘﾆｯｸ	10/16 10:50	38.4	19時間
SA-005	A（－）	新型（－）	男・59	佐久間医院	10/21 10:50	37.9	20時間
TO-1021	A（－）	新型（－）	男・24	東金病院	10/29 14:20	38.2	24時間
TO-1034	A（－）	新型（－）	女・79	東金病院	11/16 13:30	/無　後日確認	24時間
TO-1038	A（－）	新型（－）	男・59	東金病院	11/17 10:00	38	24時間
TA-006	A（－）	新型（－）	女・36	高橋医院	10/27 16:45	37.2	24時間
HO-010	A（－）	新型（－）	女・76	北辰堂	10/21 10:40	37.7	25時間
TO-1035	A（－）	新型（－）	男・61	東金病院	11/16 17:45	37.2	26時間
TO-1002	A（－）	新型（－）	男・7	東金病院	10/14 10:20	39	28時間
TO-1024	A（－）	新型（－）	男・60	東金病院	11/4 11:57	38.6	30時間
HO-018	A（－）	新型（－）	女・37	北辰堂	10/22 18:00	37.5	33時間
SA-003	A（－）	新型（－）	女・14	佐久間医院	10/20 18:00	38	35時間
TO-1036	A（－）	新型（－）	男・2	東金病院	11/17 11:00	39.8	42時間
TO-1022	A（－）	新型（－）	女・1	東金病院	11/2 14:50	40.5	46時間
HO-021	A（－）	新型（－）	女・38	北辰堂	10/26 10:20	36.6	66時間
SA-004	A（－）	新型（－）	男・46	佐久間医院	10/21 10:30	37.7	67時間
TO-1015	A（－）	新型（－）	女・24	東金病院	10/22 15:20	36.8	80時間
TO-1023	A（－）	新型（－）	男・39	東金病院	11/4 15:12	36.5	144時間

添付資料２：　分節特異的 PCR の増幅範囲



添付資料 3： 分節特異的 PCR のプライマー塩基配列

分節	PCR部位	プライマー名	プライマー塩基配列 (5'→3')
PB2	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6PB2r1	atttaggtgacactatagaaGCCAGCTGTGACTCTGATGT
	2	T7PB2f2	taatacgactcactatagggTAAGGAGGAGAGTTGATACA
	2	SP6PB2r2	atttaggtgacactatagaaTGTGCTGTGGCACATTTCCA
	3	T7PB2f3	taatacgactcactatagggGGAGAAGTGAGAAATGATGA
	3	SP6PB2r3	atttaggtgacactatagaaATGGATTCAATTCCCCAGTT
	4	T7PB2f4	taatacgactcactatagggTAGGGGCGATCTGAACTTTG
	4	SP6PB2r4	atttaggtgacactatagaaTGCCTTAGGGACAAGAGACT
	5	T7PB2f5	taatacgactcactatagggAACACTTATCAATGGATAAT
	5	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
PB1	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6PB1r1	atttaggtgacactatagaaATTAGCTGTTAGGCCATTCG
	2	T7PB1f2	taatacgactcactatagggACAAACAAGGGTAGATAAAC
	2	SP6PB1r2	atttaggtgacactatagaaTGCTCCTAGCTAAAGTTTCA
	3	T7PB1f3	taatacgactcactatagggATAAGAGCACTGACATTAAA
	3	SP6PB1r3	atttaggtgacactatagaaTTGTCCAAGATTCAGTATCG
	4	T7PB1f4	taatacgactcactatagggATTGAGAAAATAAGGCCTCT
	4	SP6PB1r4	atttaggtgacactatagaaTGTGTATCTGTAGTCTTTGA
	5	T7PB1f5	taatacgactcactatagggACATGAGTATTGGAGTAACA
	5	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
PA	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6PAr1	atttaggtgacactatagaaAAAGGAATCCCATAGACTCC
	2	T7PAf2	taatacgactcactatagggTGGCCACCAAAGCGGACTAC
	2	SP6PAr2	atttaggtgacactatagaaGGTCTTCAATACTTAATTTC
	3	T7PAf3	taatacgactcactatagggGAAGTGAACGCCAAAATTGA
	3	SP6PAr3	atttaggtgacactatagaaCTTCATTATGTATTCAGTAG
	4	T7PAf4	taatacgactcactatagggTGATTCAAGCTGGATAGAAC
	4	SP6PAr4	atttaggtgacactatagaaTGCTCTCAATCTGCTGAAGA
	5	T7PAf5	taatacgactcactatagggGCCAAGTGTCGAGGCCCATG
	5	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
HA	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6HAr1	atttaggtgacactatagaaTGTTCGAGTCATGATTGGGC
	2	T7HAf2	taatacgactcactatagggGATTATGAGGAGCTAAGAGA
	2	SP6HAr2	atttaggtgacactatagaaGATCCAGCATTTCTTTCCAT
	3	T7HAf3	taatacgactcactatagggACTGGACACTAGTAGAGCCG
	3	SP6HAr3	atttaggtgacactatagaaCTCTTTACCTACTGCTGTGA
	4	T7HAf4	taatacgactcactatagggCGACCTGAAGAGCACACAGA
	4	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
NP	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6NPr1	atttaggtgacactatagaaTTCACCGCAGCACCTGCGGC
	2	T7NPf2	taatacgactcactatagggTGATGCCACATATCAGAGAA
	2	SP6NPr2	atttaggtgacactatagaaGGAATCACTTTCTTTCCTCT
	3	T7NPf3	taatacgactcactatagggAAGTGGTCAGCCTGATGAGA
	3	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
NA	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6NAr1	atttaggtgacactatagaaATTAGGGTTCGATATGGGCT
	2	T7NAf2	taatacgactcactatagggCCTTGGAATGCAGAACCTTC
	2	SP6NAr2	atttaggtgacactatagaaGATTGTCTCCGAAAATCCCA
	3	T7NAf3	taatacgactcactatagggAAAGGGAAAGATAGTCAAAT
	3	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
M	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6MPr1	atttaggtgacactatagaaTCAGCAATCTGTTCACAAGT
	2	T7MPf2	taatacgactcactatagggCACTTGCCAGTTGCATGGGC
	2	SP6MPr2.	atttaggtgacactatagaaCGAGAGGATCACTTGAATCG
	3	T7MPf3	taatacgactcactatagggCTAGCTCCAGTGCTGGTCTG
	3	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
NS	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6NSr1	atttaggtgacactatagaaAACTATTGCTCCCTCCTCAG
	2	T7NSf2	taatacgactcactatagggCGATTGGACCAGGCGATCAT
	2	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG

付録資料 2

SmartAmp 法を用いたインフルエンザウイルスの検出と診断への応用に関する研究

最終報告書

臨床研究責任者
いすみ医療センター
副院長：伴　俊明

臨床研究担当医師
いすみ医療センター
内科医師：川野　英一郎

臨床検査担当責任者
いすみ医療センター
臨床検査科長：齊藤　美朝

研究統括
理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域
領域長：林崎 良英

SmartAmp 技術開発担当責任者
理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域
客員研究員　川井 雄輝

インフルエンザプロジェクト研究責任者
理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域
客員主管研究員：石川 智久

文責：石川智久

目 次

1. 要旨 81
2. 研究組織と臨床研究の経緯 82
3. 研究の背景と意義 84
4. 研究の目的 87
5. 臨床研究における法令順守 87
6. 対象症例の選択 88
7. 収集する臨床データ 88
8. 患者に対する説明と同意の取得 88
9. 披験者の登録と披験者情報の管理 89
10. 研究デザイン 89
11. 研究方法 90
11-1. 免疫クロマト法による判定 90
11-2. SmartAmp 法によるインフルエンザウイルスの検出 90
11-3. ウイルス塩基配列解析のため凍結検体を理化学研究所へ搬送 92
11-4. 理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域の受け入れ体制 92
11-5. 検体の処理とインフルエンザウイルスのシークエンス解析 93
12. 臨床研究の結果 95
12-1. 検体の採取 95
12-2. 免疫クロマトと SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の比較 95
12-3. 免疫クロマト「陰性」 vs. SmartAmp 法「陽性」の検体と詳細な解析 97
12-4. シークエンス解析データ 98
13. 考察 99
14. 謝辞 100
15. 参考文献 100
16. 添付資料 101
添付資料 1. いすみ医療センターにおける臨床研究の結果一覧 101
添付資料 2. 免疫クロマト・SmartAmp・のシークエンス解析結果の比較 102
添付資料 3. 分節特異的 PCR の増幅範囲 103
添付資料 4. 分節特異的 PCR のプライマー塩基配列 104
添付資料 5. シークエンス解析で発見された変異：
検体 IS-4(11/5), IS-24(11/20), IS-25, IS-70(11/5), IS-118 105

1. 要旨

いすみ医療センターにおいて、平成２１年１０月１９日から１１月２４日の期間において、発熱がありインフルエンザ感染が疑われる外来患者を対象として、SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の臨床研究を実施した。患者から採取した鼻腔ぬぐい液検体（インフォームドコンセントと連結可能匿名化済み）を使い、免疫クロマト法による A 型インフルエンザウイルスの検出、および SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルスの検出を行った。そして免疫クロマト法と SmartAmp 法の結果を比較検討した。

合計３１検体のうち、１０検体は免疫クロマト法と SmartAmp 法で共に「陽性」と判定された。また１８検体は、免疫クロマト法と SmartAmp 法で共に「陰性」と判定された。一方、免疫クロマト法で「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定されたのは 3 検体。免疫クロマト法で A 型インフルエンザ「陽性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陰性」と判定された検体は無かった。

免疫クロマト法で「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で「陽性」と判定された３検体については特に、ウイルスゲノムの塩基配列解析および定量的 RT-PCR によって SmartAmp 法の結果を検証して、その結果を裏付けるデータを得た。

A 型インフルエンザウイルスの分節は 5’-および 3’-末端に共通シークエンスを持つので、5’-ACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG-3’ および 5’-ACGCGTGATCAGTAGAAAGG-3’のプライマーを用いてマルチセグメント RT-PCR を行い、その後さらに分節特異的 PCR を行った。そしてその PCR 生成物の塩基配列を解析した。その結果、合計３１検体のうち１６検体において HA 分節と NA 分節のシークエンス解析ができた。そして SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定された１３検体全てはシークエンス解析結果によって、”2009 pandemic influenza A/H1N1 virus”と同定された。NA 分節のシークエンス解析では、タミフル耐性およびリレンザ耐性の変異は見つからなかった。一方５検体において、HA 分節(H1)に複数個の変異が発見された。しかし、その変異による SmartAmp 法の感度に対する影響はほとんどないと考えられた。

尚、本研究は、理化学研究所およびいすみ医療センターの倫理審査委員会で承認を得て、両者間で共同研究契約を締結して実施したものである。実施にあたっては、文部科学省、厚生労働省および経済産業省において共同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」と厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針（平成２０年７月３１日改正)」および「ヘルシンキ宣言（2008 年改訂)」を遵守して行った。

2. 研究組織と臨床研究の経緯

臨床研究実施機関: いすみ医療センター（千葉県いすみ市苅谷 1177）

臨床研究責任者

伴　俊明　　いすみ医療センター　副院長

臨床研究担当医師

川野英一郎　　いすみ医療センター　内科

研究協力医師

佐野　英樹
柴田　貴久
岩佐　亮太
正田　稔子
大森　敏生

臨床検査担当責任者・検体管理者（臨床研究実施機関）

齊藤　美朝　　いすみ医療センター　臨床検査科長

個人情報管理者（臨床研究実施機関）

伊大知　幸俊　　いすみ医療センター　事務長

個人情報管理補助者（臨床研究実施機関）

渡辺　義之　　いすみ医療センター　事務

理化学研究所　横浜研究所（横浜市鶴見区末広町 1-7-22）

研究実施統括

林崎良英　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　領域長

インフルエンザプロジェクト研究責任者

石川智久　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　客員主管研究員

SmartAmp 技術開発担当責任者

川井雄輝　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　客員研究員

GeNAS 運営管理者・シークエンス解析研究責任者

河合　純　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　副領域長

GeNAS 信頼性保証部門

真鍋理一郎　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　上級研究員

インフルエンザウイルスゲノム解析担当研究者

Jean-Etienne Morlighem　理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域　技術員

研究事務局

理化学研究所　横浜研究所　オミックス基盤研究領域
インフルエンザプロジェクト臨床研究事務局
統括責任者　石川智久
〒230-0045
横浜市鶴見区末広町 1-7-22
電話：045-503-9179　Fax：045-503-9216

臨床研究の経緯

臨床研究計画書（第 1 版 2009 年 9 月 23 日）

共同研究契約書（契約日 2009 年 10 月 1 日）

倫理委員会申請（2009 年 10 月 1 日）
倫理委員会開催（2009 年 10 月 13-14 日持ち回り審議）
倫理委員会の承認（2009 年 10 月 15 日）

臨床研究の開始（2009 年 10 月 19 日）
臨床研究の終了（2009 年 11 月 24 日）

最終報告書（2010 年 1 月 25 日）

3. 研究の背景と意義

近年、これまでになかった危険な、あるいは高い感染能力をもつインフルエンザウイルスのパンデミックな流行が、世界的な問題となっている。世界保健機関（WHO）は、新型インフルエンザの警戒水準（フェーズ）を最高度の「６」に引き上げ、世界的大流行（パンデミック）が発生したと宣言した。チャン事務局長は記者会見で「これは 2009 インフルエンザ・パンデミックである」と表明した。新型インフルエンザの世界的大流行は 1968 年に発生した「香港風邪」以来 41 年ぶりである。

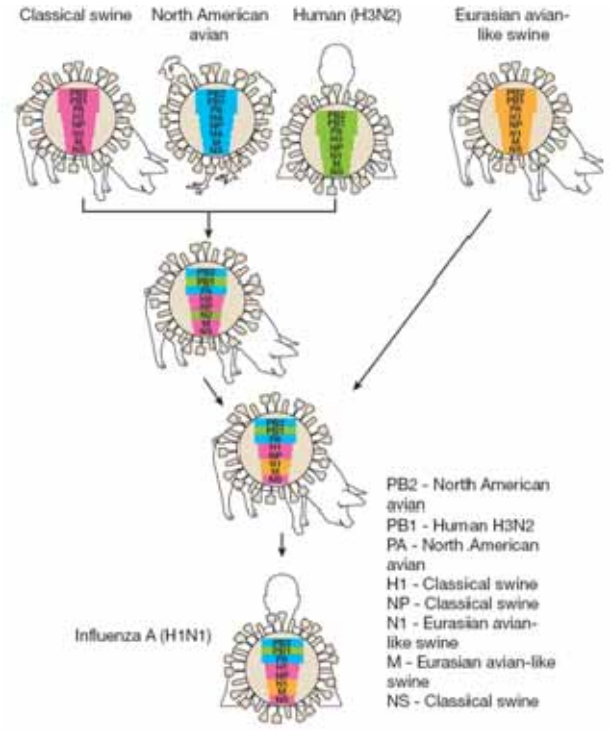
インフルエンザウイルスとは、オルトミクソウイルス科に分類されるウイルスのうち、A 型インフルエンザウイルス、B 型インフルエンザウイルス、C 型インフルエンザウイルスの 3 属を指す。特に、A 型は内部での変異型が多く世界的な大流行を起こしやすい。インフルエンザウイルス遺伝子は１本鎖 RNA である。A 型インフルエンザウイルスの RNA ゲノムは 8 分節 (HA, NA, PA, PB1, PB2, M, NP, NS) からなる。HA, haemagglutinin; NA, neuraminidase, PA, RNA polymerase a; PB1, RNA polymerase b1 ; PB2, RNA polymerase b2; M, matrix; NP, nucleoprotein, NS, non-structure.

A 型インフルエンザウイルスでは、特に HA と NA のゲノムに変異が多く、これまで HA に 16 種類、NA に 9 種類の大きな変異が見つかっており、その組み合わせの数の亜型が存在しうる。亜型の違いは H1N1 - H16N9 といった略称で表現されている。ヒトのインフルエンザの原因になることが明らかになっているのは 2009 年現在で、「A ソ連型」として知られている H1N1、「A 香港型」として知られている H3N2、H1N2、H2N2、の 4 種類である。この他に H9N1、高病原性トリインフルエンザとして有名になった H5N1 などのいくつかの種類がヒトに感染した例が報告されているが、ヒトからヒトへの伝染性が低かったため大流行には至っていない。しかし、いずれ新型インフルエンザが定期的に大流行を起こすことは予言されつづけてきた。

今年メキシコや米国等で確認された新しい豚インフルエンザ（H1N1）を感染症法第 6 条第 7 号に規定する新型インフルエンザ等感染症に位置づけ、感染の拡大を防止するための様々な対応が国際的な連携のもとに始められている。新型インフルエンザは、その遺伝子が豚インフルエンザのものに似ていることから、確認当初は豚インフルエンザ(Swine A/H1N1)と呼ばれた。しかしその後の研究で、今回のインフルエンザウイルスが豚インフルエンザウイルスの遺伝子のほかに、鳥インフルエンザウイルス及びヒトインフルエンザウイルスの遺伝子も持つことが確認されている [1-3]【図１】。

今回のブタ由来の新型インフルエンザは、季節性インフルエンザと類似していると考えられているものの、一部に重篤化する症例がみられており、注意が必要である。サルを用いた実験では、季節性インフルエンザウイルスは、咽頭や扁桃、気管、気管支、肺の一部で増殖し

たのに対して、新型インフルエンザウイルスは鼻粘膜、咽頭、扁桃、気管、気管支、肺のすべての部分で増殖した。季節性インフルエンザに比較して新型インフルエンザウイルスの方が 10 倍から 1 万倍程度感染力が強いと考えられている[4,5]。



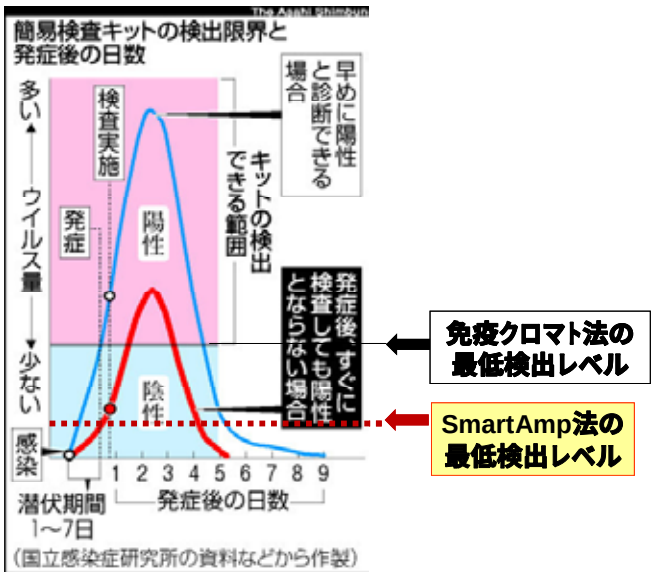
Neumann et al., *Nature* 459, 931-939 (2009)

図 1　ブタ由来インフルエンザ A/H1N1 ウィルスの発生

PCR による遺伝子診断を行った患者の 98.7%が新型インフルエンザである。年齢別にみると、5～9 歳が最多で 5 万 8553 人、次いで 10～14 歳が 5 万 3268 人（33.4%）、0～4 歳 1 万 9053 人（11.9%）の順である。11 月 9 日、国立感染症研究所は、10 月 26 日～11 月 1 日の 1 週間のインフルエンザ患者の報告数で、5～9 歳が 36.7%を占め、それまで流行の中心だった 10～14 歳を上回ったと発表した。5～9 歳は重症化する傾向がある。また、さらに糖尿病や喘息等の基礎疾患がある患者等を中心に重症化する例が報告されている。さらにタミフル耐性の新型インフルエンザウイルスの検出は 10 月までに１２例となった。いずれも単発例であり、周囲への感染拡大は認められていないが、要注意である。特に妊婦、小児および糖尿病や喘息等の基礎疾患がある患者においては、早期の診断が極めて重要である。したがって、新型インフルエンザウイルスを迅速かつ高感度に検出する方法の確立は焦眉の急である。

理化学研究所オミックス基盤研究領域（理研 OSC）は、ヒト由来試料（鼻腔ぬぐい液検体）を用いて、Smart Amplification Process (SmartAmp 法)により、ウイルスの検出を迅速簡便に同定できるシステムの開発に取り組んできた。SmartAmp 法は、理研が開発した遺伝子検出法で、ターゲットとする配列の核酸のみを増幅させることにより、その存在を検出する方法である[6,7]。　今回、開発しているキットは、検体採取後、比較的簡単な手技で約 1 時間以内に

新型インフルエンザウイルスに特有の遺伝子配列を増幅して、検出することができるものである。



免疫クロマト法で陽性と判断された患者のスワブ検体および単離培養したインフルエンザウイルス株（共同研究契約を締結した医療機関および横浜市衛生研究所より提供）を用いて、新型インフルエンザウイルスの検出に最適のプライマーを調整した。その結果、*in vitro* の実験では、SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の感度は従来の簡易検出キット（免疫クロマト法）の感度よりも有意に高く、且つ新型インフルエンザウイルスに特異的で、他のインフルエンザウイルス（季節性 A 型、B 型など）とは交差反応しないことが判明した。

図 2　簡易検査キットの検出限界とウイルス量

理化学研究所で独自に開発した SmartAmp 法を活用することで、亜型同定のための核酸抽出処理が不要となり、迅速・簡便・安価なウイルス同定システムを開発することができ、パンデミックの際に迅速な対応が可能となる【図３】。同時にインフルエンザウイルスのゲノム塩基配列を確認することで、SmartAmp 法の確実性が検証可能となる。具体的には例えば、従来の季節性インフルエンザと新型インフルエンザを区別して検出することが可能となる。さらに、将来的には、タミフル耐性ウイルスの検出も含めて 1 時間以内に同定が可能となると考えられる。

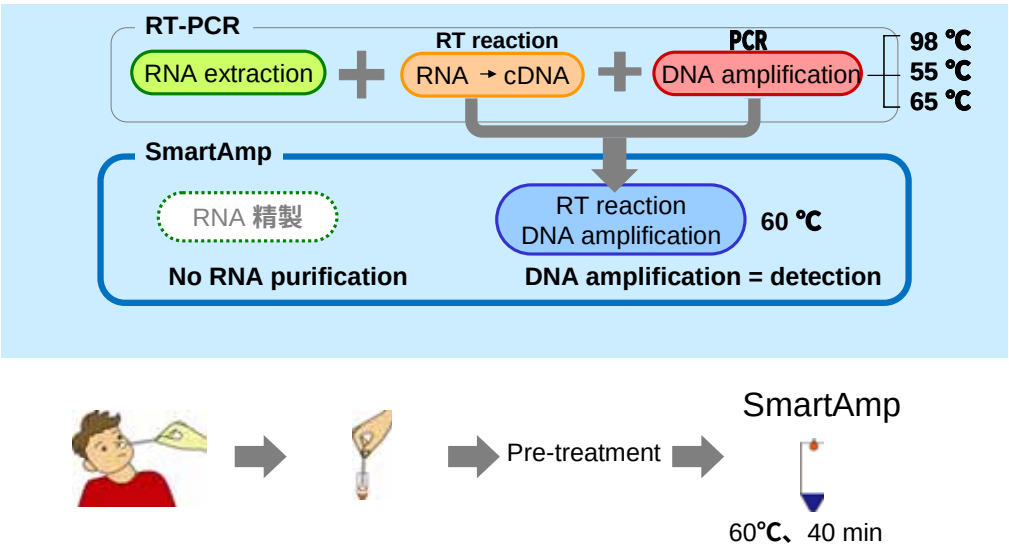


図 3　SmartAmp 法によるインフルエンザウイルス検出の手順

4. 研究の目的

主目的：

本臨床研究の目的は、SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の有効性を臨床現場で検証することである。そのため、発熱がありインフルエンザ感染が疑われる患者を対象として、その患者から鼻腔ぬぐい液検体（連結可能匿名化済み）を採取して、免疫クロマト法（(株)富士レビオ：インフルエンザウイルスキット、(株)タウンズ：イムノエース Flu 等）で A 型インフルエンザ抗原検出を行う。一方、同一患者から鼻腔ぬぐい液検体を別途採取し、SmartAmp 法によって新型インフルエンザウイルスを検出する。そして、インフルエンザを検出する免疫クロマト法と SmartAmp 法の結果を比較検討する。

副次的目的：

（1）必要があれば、鼻腔ぬぐい液検体中のウイルスゲノムのシークエンス解析を行う（理化学研究所横浜研究所　GeNAS に委託）。

（2）SmartAmp 法の結果とゲノムシークエンス結果を比較し、SmartAmp 法による検出の正確度を検証する（理化学研究所横浜研究所）。

（3）ウイルスゲノムのシークエンス解析の結果、タミフル耐性の変異が発見された場合、理化学研究所のインフルエンザプロジェクト研究責任者がいすみ医療センターの臨床研究担当医師に連絡する。

5. 臨床研究における法令遵守

新型インフルエンザ H1N1 ウイルスを迅速且つ高感度で検出する体外診断法の開発を目標として、SmartAmp 法の実用性を臨床現場で検証する自主臨床研究である。具体的には、インフルエンザ患者の Swab サンプル（鼻腔ぬぐい液検体）を用いて、新型インフルエンザ A/H1N1 ウイルスを SmartAmp 法によって検出する。本臨床研究の計画書は、いすみ医療センターの倫理委員会で審査され、2009 年 10 月 15 日に承認された。

本研究は、文部科学省、厚生労働省および経済産業省において共同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」と厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年 7 月 31 日改正）」および「ヘルシンキ宣言（2008 年改訂）」を遵守した。また GCP に準拠してデータの信頼性を担保し、当該臨床研究に参加する患者の同意の下で実施する。さらに、国立感染症研究所の「新型インフルエンザウイルス検査対応指針と検体搬送のガイドライン（2009 年 5 月 3 日　暫定版）」を遵守した。

臨床研究責任者、臨床研究担当医師および研究協力者が本研究に係る医療情報および同意書等を取扱う際は、対象患者の秘密保護に十分配慮した。理化学研究所内で取り扱うデータは、臨床研究実施機関が付ける患者整理番号により連結可能匿名化を行なったデータのみとした。研究結果を公表する際は、対象患者を特定できる情報を含まない。

6. 対象症例の選択

対象患者

発熱がありインフルエンザ感染が疑われる患者

選択基準

下記①②の条件を満たす被検者

①インフルエンザ様症状を呈した患者

＊インフルエンザ様症状とは以下の 1)かつ 2)を満たすもの

1) 37.5℃以上の発熱

受診時に限定するものではなく、経過中の最高体温が 37.5℃以上

2) 急性呼吸器症状などの臨床症状

咳、咽頭・喉頭痛、倦怠感、喀痰、鼻汁・鼻閉、頭痛など

② 本人、またはその代諾者から書面にて同意が得られた被検者

除外基準

① 他の医療機器・薬剤の治験に参加しているか、もしくは治験終了後 3 ヶ月が経過していない患者

② その他、臨床研究担当医師が不適当と判断する患者

7. 収集する臨床データ

収集する臨床データとしては：患者の年齢、性、身体所見（身長、体重)、体温、インフルエンザ特有の症状（発熱、咳、咽頭痛、倦怠感、喀痰、鼻汁・鼻閉、頭痛、関節痛等）および薬の服用の有無、薬の名称（服用した場合）と服用量などを含む。

妊婦、幼児、高齢者、慢性呼吸器疾患・慢性心疾患・代謝性疾患（糖尿病等)・腎機能障害・免疫機能不全（ステロイド全身投与等）等を有しており、治療経過や管理の状況等を勘案して医師により重症化のリスクが高いと判断される被験者は、臨床データに特記する。

研究担当医師および研究協力者が本研究に係る医療情報および同意書等を取り扱う際は、対象患者の秘密保護に十分配慮する。提出するデータは、患者整理番号により連結可能匿名化を行ったデータのみとする。研究結果を公表する際は、対象患者を特定できる情報を含まないようにする。本研究の目的以外に、研究で得られたデータを原則的に使用しない。

8. 患者に対する説明と同意の取得

いすみ医療センターを受診した外来患者で、発熱がありインフルエンザ感染が疑われるものに対して当該臨床研究について臨床研究担当医師または研究協力医師が説明を行い、臨床研究に参加する同意を示す書面（同意書：インフォームドコンセント）を患者から頂く。

9.　披験者の登録と披験者情報の管理

臨床研究実施医療機関の臨床研究担当医師あるいは研究協力者は、対象条件（4. 対象症例の選択）を満たす患者（被験者）を所定の登録用紙に記入し、個人情報管理者に提出する。個人情報管理者は被験者の登録を行い、臨床研究担当者に連結可能匿名化のための割付番号を連絡する。その連絡を受けて、臨床研究担当者は本研究のためのスワブ処理を開始する。被験者の臨床情報は、臨床研究実施医療機関の臨床研究担当医師あるいは研究協力医師が管理する。

10.　研究デザイン

患者から採取された鼻腔ぬぐい液検体（連結可能匿名化済みサンプル）を用いて、免疫クロマト法でA型インフルエンザ陽性か陰性かの判定を行う。免疫クロマト法による判定には、市販のキット（(株)富士レビオ：エスプラインインフルエンザ®A&B-N キット、(株)タウンズ：イムノエース Flu 等）を用いる。

免疫クロマト検査後、残りの鼻腔ぬぐい液検体（市販キット）から約 100 µl を無菌チューブ（理化学研究所から提供）に移し凍結する。その凍結検体を理化学研究所横浜研究所・オミックス基盤研究領域に搬送する。その際、国立感染症研究所の「新型インフルエンザウイルス検査対応指針と検体搬送のガイドライン（2009 年 5 月 3 日　暫定版）」を遵守し、臨床検体搬送業者に委託する。

一方、SmartAmp 用綿棒（理研から提供されたキット）を用いて、同一患者から別途鼻腔ぬぐい液（スワブ検体）を採取する【図４】。

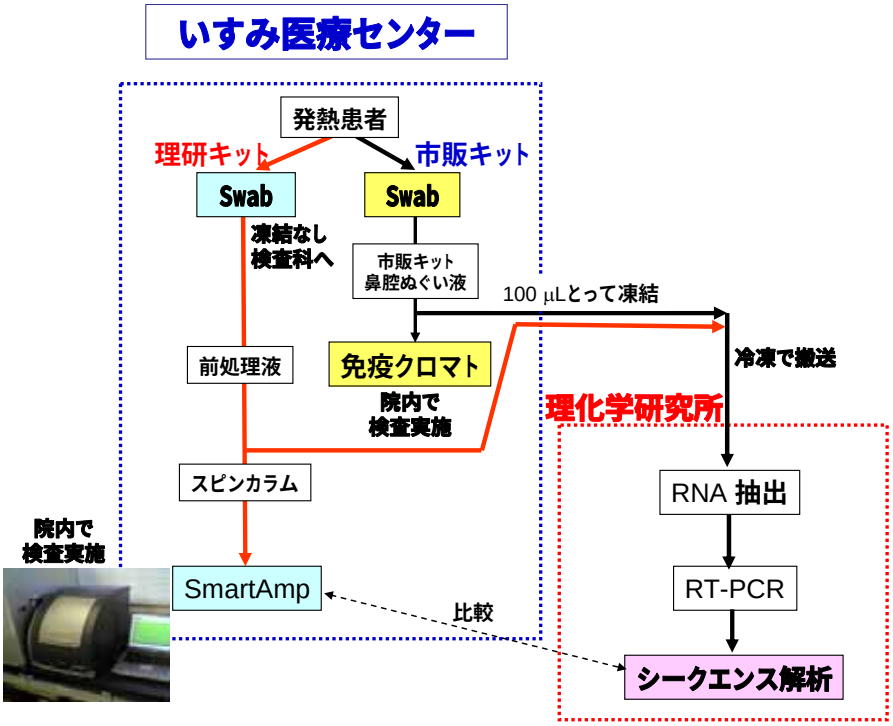


図４　いすみ医療センターにおける検体の採取と検体の処理方法

いすみ医療センターでは、採取した検体に対して前処理を行った後、SmartAmp 法で直接インフルエンザウイルスを検出する。この検出によって、新型インフルエンザウイルス陽性・陰性を判定する。

理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域では、いすみ医療センターから搬送された鼻腔ぬぐい液検体（免疫クロマト検査で残った約 100 μl の凍結検体および SmartAmp 検出後の残り液の凍結検体）を受理し、融解して RNA 抽出したあと、multi-segment RT-PCR による RNA→cDNA 生成と分節特異的 PCR による DNA 増幅をおこなう【図４】。そして PCR で増幅した DNA をシークエンス解析する。それらの結果を、SmartAmp 法によるインフルエンザウイルス検出結果と比較することにより、SmartAmp 法の正確さを検証する。必要な場合には、定量的 RT-PCR により新型インフルエンザウイルスの有無を確認する。

11.　研究方法

11-1. 免疫クロマト法による判定

免疫クロマト法により A 型インフルエンザウイルスの陽性・陰性を判定する。その手順と方法については、市販のキットの添付文書の方法に従うものとする。

検体採取 #1（**免疫クロマト法検査用**）：
市販のキット（(株)富士レビオ　エスプラインインフルエンザ®A&B-N キット、(株)タウンズ：イムノエース Flu 等）に付属する滅菌綿棒を用いて、鼻腔粘液を採取する。その際、添付文書の方法に従う。検体容器には検体番号のみを記載し、被検者を特定できる情報を記入しない。研究本部に提出するデータは、連結可能匿名化を行なったデータのみとする。

11-2. SmartAmp 法によるインフルエンザウイルスの検出

検体採取 #2（**SmartAmp 法検出用**）：
同一患者の別の鼻の穴から理研キットの滅菌綿棒を用いて、鼻腔からスワブ検体を採取する。その方法は原理的には上述の市販キットを用いた検体採取と同じである。
SmartAmp 法の手順は「SmartAmp 新型インフルエンザ A/H1N1 ウイルス検出キット:検査の準備と手順」に従う。

【カラムの準備】
１．１検体につき、カラム１本、空のチューブ２本を用意。
２．カラムのツメを折って、空のチューブにセットする。
３．チューブにセットしたカラムを小型卓上遠心機で１分間遠心【図５】。
４．カラムを新しい空チューブに移し、これを「準備済みカラム」とする。

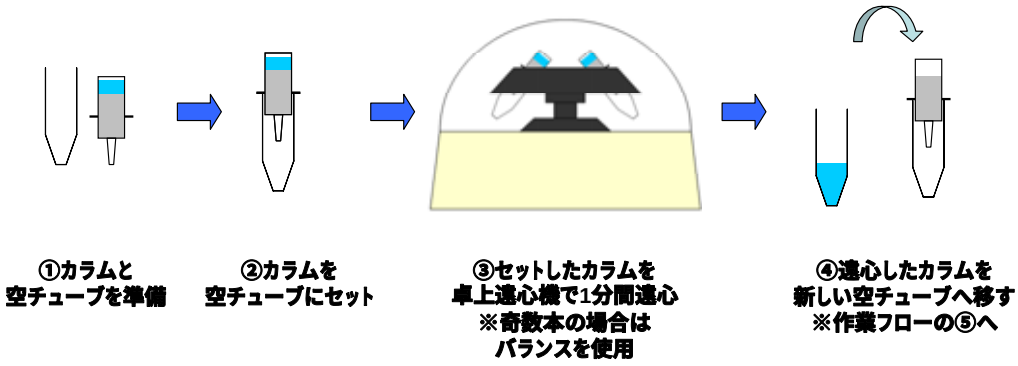


図 5　前処理用カラムの準備

【前処理操作】

1．綿棒を所定のカッターで切断し、綿部分を滅菌チューブにいれる【図 6 】。
2．検体を入れたチューブに前処理液 300 μL を入れる。
3．しっかりと蓋を閉め、ボルテックスミキサーで 30 秒間撹拌する。
4．「準備済みカラム」の蓋を開け、**サンプル液** 15 μL を滴下する。
5．そのカラムを小型卓上遠心機で 1 分間遠心する。
6．カラム部分を取り外し、チューブに残った液を**処理済みサンプル**とする。

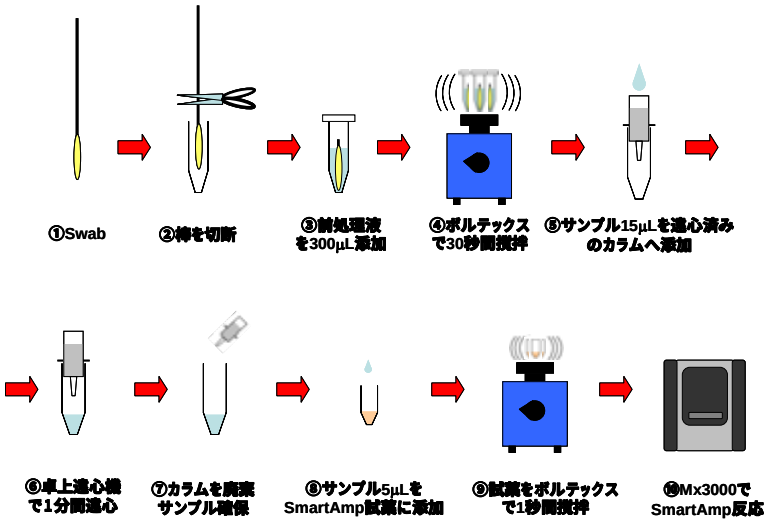


図 6　SmartAmp 法の前処理操作

【試薬の準備】

1．-20℃で保存したキット試薬を室温で解凍し、すぐにクーラーラックに移す。
　使用する分（検体数＋2 テスト分）だけ取り出し、そのほかの試薬は絶対に解凍しない。
2．使用する試薬すべて小型卓上遠心機でスピンダウンする。
3．試薬が飛び散らないように静かに蓋を外す。
4．**処理済みサンプル** 5 μL を検体用試薬チューブに添加する。最終量：25 μL。
5．陽性コントロール用チューブに陽性コントロール試薬を 5 μL 添加する。(最終量：25 μL)
6．陰性コントロール用チューブに陰性コントロール試薬を 5 μL 添加する。(最終量：25 μL)
7．蓋をしっかりと閉め、十分にタッピング後スピンダウンする。

【SmartAmp 反応】

３．リアルタイムPCR 装置を用いて、上述のSmartAmp反応サンプルを60℃で反応させる.
（装置の設定方法および操作方法は装置の取扱説明書を参照。）

４．40分後の蛍光強度が3000を超えた場合、陽性と判断し、それより以下は陰性と判断する。

11-3.ウイルス塩基配列解析のため凍結検体を理化学研究所へ搬送

免疫クロマト検査後、残りの鼻腔ぬぐい液検体（市販キット）から約 100 μL を取り出し、無菌チューブ（理化学研究所から提供）に移し、ドライアイス等で凍結する。さらに SmartAmp 検出後、その残液も凍結する。そして、理化学研究所横浜研究所・オミックス基盤研究領域にまとめて搬送する。これらの搬送は、凍結検体をドライアイスとともに搬送する。インフルエンザ患者から採取した臨床検体はカテゴリーB扱いとする。理化学研究所横浜研究所より供与されるウイルス検体搬送用容器（バイオセーフティーパック DSP150）を用いて、搬送専門業者により速やかに検体搬送を行う。

バイオセーフティーパック DSP150: 感染性物質や菌体の輸送用に開発された容器で、吸収剤、エアーキャップ、エアーキャップバッグ、緩衝材、緩衝板、95kPa 耐圧二次容器、外装容器からなる。この搬送容器は空路、陸路、航路における輸送を目的とした規定（国立感染症研究所「新型インフルエンザウイルス検査対応指針と検体搬送のガイドライン」）を全て満たす。

11-4. 理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域の受け入れ体制

理化学研究所・横浜研究所・オミックス基盤研究領域において、搬送された検体を BSL-2 施設（W-315 室）の施錠のできる-80℃冷凍庫（長期間保存の場合）で保管する【図７】。検体の搬入、使用、破棄については、理研・検体管理者が管理するログブックにその都度記入する。理化学研究所オミックス基盤研究領域　西棟 W-315 (BSL-2)実験室利用マニュアル(2009 年 7 月 28 日版)に従う。横浜研究所研究倫理委員会に提出し承認された研究計画書「SmartAmp 法及び塩基配列決定によるインフルエンザウイルス同定システムの開発」（横浜 H21-12；2009 年 7 月 31 日承認）に従って、研究を実施する。

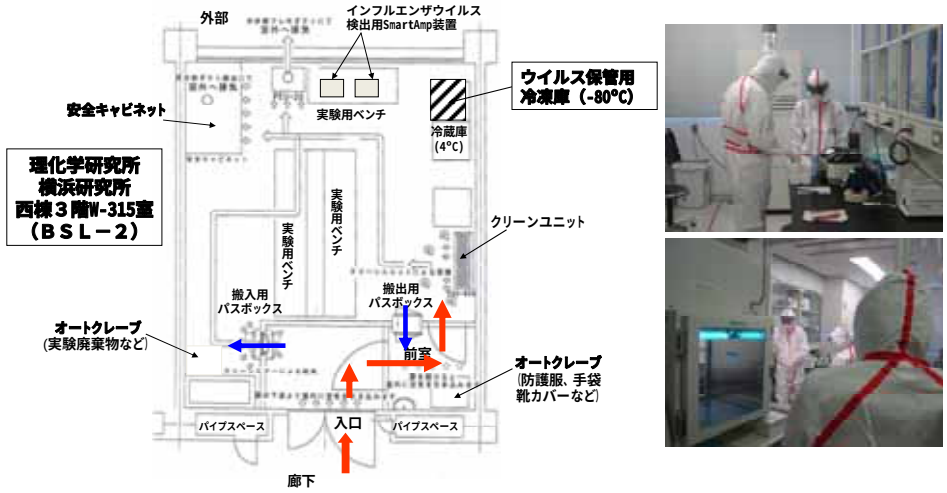


図７　インフルエンザ患者の検体を保管および RNA 抽出するために安全性を向上させた BSL-2 実験室

11-5. 検体の処理とインフルエンザウイルスのシークエンス解析

理化学研究所オミックス基盤研究領域の「シークエンスに関する手順書」第１版に従って、臨床研究を実施する医療機関から搬送されてきた検体からインフルエンザウイルスのゲノム RNA を抽出・精製して、逆転写(RT)-PCR 等を行った後、塩基配列を解析する（GeNAS に委託)。

＜ウイルス RNA の抽出・精製＞

インフルエンザウイルス検体からの感染を防ぐために、ウイルス RNA の抽出・精製は理化学研究所・西棟 W-315 室で行うものとする。「理化学研究所オミックス基盤研究領域　西棟 W-315 (BSL-2)実験質利用マニュアル」(2009 年 7 月 28 日版)に従う。横浜研究所研究倫理委員会に提出し承認された研究計画書「SmartAmp 法及び塩基配列決定によるインフルエンザウイルス同定システムの開発」（横浜 H21-12；2009 年 7 月 31 日承認）に従って、以下の研究を実施する。

融解した検体溶液からインフルエンザウイルス RNA を抽出･精製する。その方法は QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit のプロトコールに従う。

抽出･精製したウイルス RNA を保管する際は、W-315 室内の-80℃冷凍庫に入れて保管する。そのまま RNA 濃度を測定するときは、W-315 室の Pass-out と記されたパスボックスを通して室外へ出す。RNA 濃度を、「シークエンスに関する手順書」第１版に従って、NanoDrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC 社)を用いて測定する。

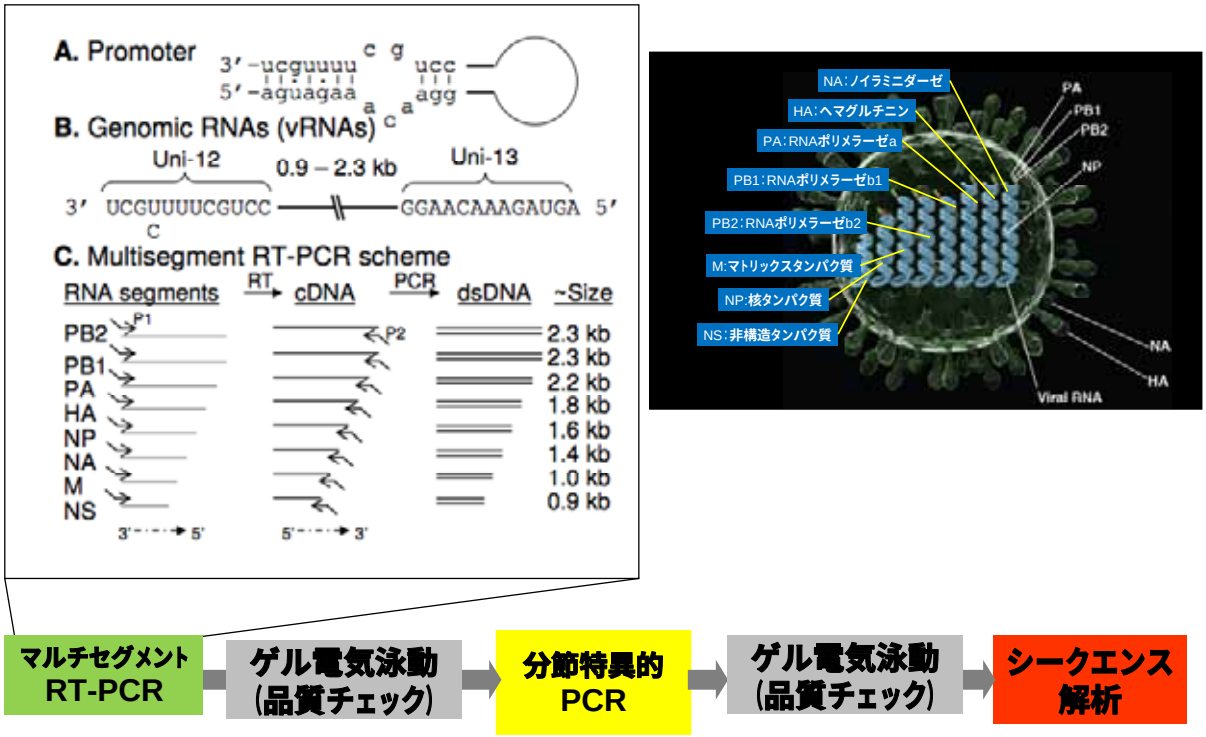


図 8　インフルエンザウイルスのシークエンス解析の手順

インフルエンザウイルスのゲノムは１本鎖 RNA であることから、まず逆転写 (RT) 反応によって RNA から相補的 DNA (cDNA)を生成する。A 型インフルエンザウイルスの RNA ゲノムは 8 分節(HA, NA, PA, PB1, PB2, M, NP, NS)からなり、それぞれの分節は 5’-および 3’-末端に共通シークエンスを持つ[8]。その性質に基づいて、5’-ACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG-3’および 5’-ACGCGTGATCAGTAGAAAGG-3’のプライマーを用いてマルチセグメント RT-PCR を行う[8]【図８】。
ターゲットフラグメントの有無を確認するために、RT-PCR 産物のサイズを 1.5%アガロースゲル電気泳動法によって確認する。「シークエンスに関する手順書」第１版に従って、実験を行う。UV 照射しながらルミノ・イメージアナライザーを用いて電気泳動法結果を撮影し、電子ファイルと紙媒体に記録する。

＜分節特異的 PCR＞
HA 分節と NA 分節を数個のフラグメントに分けて PCR で増幅する。その際プライマーの 5’端には T7 または SP6 プロモーター配列をつけておく（添付資料３と添付資料４）。PCR の条件は「シークエンスに関する手順書」第１版を参照すること。ターゲットフラグメントの有無を確認するために、PCR 産物のサイズを 1.5%アガロースゲル電気泳動法によって確認する。ターゲットフラグメントの品質をチェックするために、UV 照射しながらルミノ・イメージアナライザーを用いてゲル電気泳動法の結果を撮影し、電子ファイルと紙媒体に記録する。

＜シーケンシング反応と塩基配列測定＞
濃度調製済み PCR 産物を、「シークエンスに関する手順書」第１版に従って、シーケンシング反応にかける。シーケンシング反応後の溶液を MultiScreen-HTS HV でゲル濾過精製する。そうして精製できたサンプル(15 μL)を ABI 3730 xl にかけてシークエンス解析する。
当該研究においては、A 型インフルエンザウイルス RNA ゲノムの 8 分節のうち、HA 分節と NA 分節の解析を優先的に行う。（SmartAmp 法で HA 分節を検出する一方、NA 分節の変異はタミフル耐性またはリレンザ耐性に関係するため。）

＜シークエンス結果の評価＞
RT-PCR および分節特異的 PCR の産物に関して、その品質をチェックするために、UV 照射しながらルミノ・イメージアナライザーを用いてゲル電気泳動法の結果を撮影し、電子ファイルと紙媒体に記録するものとする。特に、分節特異的 PCR の産物はゲル電気泳動法の結果、単一バンドであることを確認し、シーケンシング反応を行う。RT-PCR の産物に関しては、HA, NP, NA, M, NS 分節を確認する。検体におけるウイルスの量が少ない場合、これらの分節をシークエンス解析で確認できない場合がある。その場合には、Roche 社の新型インフルエンザウイルス検出キットを用いた定量的 RT-PCR で、M と HA 分節の有無と量を測定する。

12.　臨床研究の結果

12-1. 検体の採取

千葉県のいすみ医療センターにおいて、平成２１年１０月19日から１１月２４日の期間で、発熱がありインフルエンザ感染が疑われる患者を対象として、臨床研究を実施した。患者から鼻腔ぬぐい液検体（インフォームドコンセントと連結可能匿名化済み）を採取して、合計３１検体について免疫クロマト法による A 型インフルエンザウィルスの検出と SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルスの検出を行い、免疫クロマト法と SmartAmp 法の結果を比較検討した（添付資料１）。さらに、免疫クロマト用検体(IC swab)および SmartAmp 法用検体から RNA を抽出し、RT 反応によって cDNA を合成し、シークエンス解析を実施した(添付資料２)。

12-2. 免疫クロマト法と SmartAmp 法による新型インフルエンザウイルス検出の比較

SmartAmp法による新型インフルエンザウイルス検出においては、Mx3000リアルタイムPCR装置を用いて、 60℃でSmartAmp反応を進行させて、反応時間40分における蛍光強度が3000を超えた場合、「陽性(+)」と判断し、それより以下は「陰性(-)」と判断した。表１は免疫クロマト法とSmartAmp法の結果を示す。（詳細は添付資料１を参照）

検体番号	免疫クロマト	SmartAmp
IS-024 (11/14)	A (-)	新型 (-)
IS-034 (10/24)	A (-)	新型 (-)
IS-058	A (-)	新型 (-)
IS-064	A (-)	新型 (-)
IS-070 (11/5)	A (-)	新型 (-)
IS-081	A (-)	新型 (-)
IS-084	A (-)	新型 (-)
IS-087	A (-)	新型 (-)
IS-100 (10/23)	A (-)	新型 (-)
IS-115	A (-)	新型 (-)
IS-116	A (-)	新型 (-)
IS-117	A (-)	新型 (-)
IS-118	A (-)	新型 (-)

IS-124 (11/16)	A (-)	新型 (-)
IS-124 (11/19)	A (-)	新型 (-)
IS-125	A (-)	新型 (-)
IS-140	A (-)	新型 (-)
IS-147	A (-)	新型 (-)
IS-026	A (-)	新型(+)
IS-113	A (-)	新型(+)
IS-146	A (-)	新型(+)
IS-004 (11/15)	A (+)	新型 (+)
IS-021	A (+)	新型 (+)
IS-022	A (+)	新型 (+)
IS-024 (11/20)	A (+)	新型 (+)
IS-025	A (+)	新型 (+)
IS-085 (10/20)	A (+)	新型 (+)
IS-085 (11/9)	A (+)	新型 (+)
IS-116 (11/12)	A (+)	新型 (+)
IS-128	A (+)	新型 (+)
IS-129	A (+)	新型 (+)

表１　いすみ医療センターの検体：免疫クロマト法と SmartAmp 法の比較

いすみ医療センターで採取した合計３１検体のうち、１０検体は免疫クロマト法で A 型インフルエンザ「陽性」と判定され、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定された【表２】。反対に１８検体は、免疫クロマト法と SmartAmp 法で共に「陰性」と判定された。一方、免疫クロマト法で「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定されたのは 3 検体。免疫クロマト法で A 型インフルエンザ「陽性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陰性」と判定された検体は無かった。

免疫クロマト	SmartAmp	検体数
A (+)	新型 (+)	10
A (+)	新型 (-)	0
A (-)	新型 (+)	3
A (-)	新型 (-)	18
合計		31

表２　いすみ医療センターの検体のまとめ：免疫クロマト法と SmartAmp 法の結果

12-3. 免疫クロマト「陰性」vs. SmartAmp 法「陽性」の検体と詳細な解析

上述したように、免疫クロマト法で A 型インフルエンザ「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定されたのは３検体（IS-026, IS-113, IS-146）あった。これらについて詳しく解析するために、免疫クロマト用検体および SmartAmp 用検体の両方から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法とシークエンス解析法で新型インフルエンザの有無を検証した（添付資料２）。

表３に示すように、これら３検体に関して、定量的 RT-PCR またはシークエンス解析によって、2009 pandemic influenza A/H1N1（新型 A/H1N1）またはその HA 分節(H1)を同定することができた。

検体番号	免疫クロマト	SmartAmp	シークエンス解析	定量RT-PCR
IS-026	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析によって2009 pandemic influennza A/H1N1と判明した SmartAmpプライマーの結合部位に変異はなかった。	ND
IS-113	A (-)	新型 (+)	シークエンス解析によって2009 pandemic influennza A/H1N1と判明した SmartAmpプライマーの結合部位に変異はなかった。	ND
IS-146	A (-)	新型 (+)	マルチセグメントRT-PCRで増幅できなかった。 よってシークエンス解析ができなかった。	HA分節 (H1)： 87,800コピー/ 5μL

表３　免疫クロマト法（−）／SmartAmp 法（+）検体のシークエンス解析と定量的 RT-PCR の結果

検体 IS-026 と IS-113 に関しては、免疫クロマト用サンプルからウイルス RNA を抽出してマルチセグメント RT-PCR で増幅した後、HA 分節と NA 分節のシークエンス解析を行った。その結果インフルエンザウイルスは”2009 pandemic influenza A/H1N1”（新型インフルエンザ）ウイルスであると判定された。

またさらに SmartAmp 法プライマーの結合部位に変異は認められなかった。シークエンス解析で新型 A/H1N1 であることが検証されたので、定量 RT-PCR を実施しなかった(上記の表に ND と表記)。

一方、検体 IS-146 では、免疫クロマト用サンプル(IC swab)からウイルス RNA を抽出してマルチセグメント RT-PCR を行ったが、増幅産物が得られなかった。そこで、SmartAmp 用サンプルを用いて、定量 RT-PCR 法で HA 分節(H1)のコピー数を算出する事を試みた。その結果、5 μL あたり 8.78×10^4 個の HA 分節(H1)が検出された。そのコピー数は SmartAmp 法の最低検出感度のレベルを上回るコピー数であった。したがってその結果は、IS-146 検体において SmartAmp 法で検出した新型 A/H1N1「陽性」の結果を裏付けるものと結論づけることができた。

12-4. シークエンス解析データ

合計３１検体のうち１６検体で、HA 分節(H1)と NA 分節のシークエンス解析を行う事ができた【表４】。その結果、2009 pandemic influenza A/H1N1 virus と同定できた。NA 分節のシークエンス解析では、タミフル耐性およびリレンザ耐性を引き起こす変異は見つからなかった。さらに、その１６検体のうち 5 検体では HA 分節(H1)に変異が見つかった。変異の発見された検体に関して、HA 分節(H1)と NA 分節のシークエンス解析データを添付資料５に示す。

検体番号	免疫クロマト	SmartAmp	シークエンス解析	変異
IS-4 (11/15)	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	OP(f)プライマー結合部位に変異
IS-21	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-22	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-24 (11/14)	A (-)	新型(-)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-24 (11/20)	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	OP(f)プライマー結合部位に変異
IS-25	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	OP(f)プライマー結合部位に変異
IS-26	A (-)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-64	A (-)	新型(-)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-70 (11/5)	A (-)	新型(-)	2009 pandemic influenza A/H1N1	OP(r)プライマー結合部位に変異
IS-85 (10/20)	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-85 (11/9)	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-113	A (-)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-116 (11/12)	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-118	A (-)	新型(-)	2009 pandemic influenza A/H1N1	OP(f)プライマー結合部位に変異
IS-128	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-129	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	

表 4　シークエンス解析により 2009 pandemic influenza A/H1N1 virus と同定された検体一覧

今回発見された変異は、SmartAmp 法の outer プライマーforward　OP(f)と outer プライマーreverse OP(r) にある事が判った。３つの検体（IS-4 (11/15)、IS-24 (11/20)、IS-25）において SmartAmp 法で新型インフルエンザウイルスを検出することができているので、これらの変異が SmartAmp 法の感度を著しく劣化させたとは考えられない。のこりの 2 つの検体（IA-70 (11/5)と IS-118）においては、ウイルスレベルが低かった（または無かった）ため、SmartAmp 法で検出できなかったと考えられる。

13. 考察

本臨床研究を始めるにあたって、横浜市衛生研究所より提供のあった単離培養した新型 A インフルエンザウイルス株に対して、その HA 分節を検出するプライマーを用いた SmartAmp 法は、検出感度において免疫クロマトよりも有意に高い感度を持つことが明らかになった。さらに、*in vitro* では、新型インフルエンザウイルスの HA 分節を検出するプライマーは、季節性 A/H1N1、季節性 A/H3N2、B 型 (Yakagata) には交差せず、新型インフルエンザウイルス ”2009 pandemic influenza A/H1N1virus “に対して極めて特異性が高いことが示されている。

一方、鼻腔ぬぐい液検体中には、反応を阻害する物質（タンパク質）が混在しており、直接的に RT-SmartAmp 反応を行うことはできなかった。そのために、阻害物質を取り除く前処理が必要不可欠であることが判明した。前処理カラムを使うことにより、阻害物質とウイルス RNA を分離することが可能になった。

いすみ医療センターで採取した合計３１検体のうち、１０検体は免疫クロマト法で A 型インフルエンザ「陽性」と判定され、且つ SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定された。反対に１８検体は、免疫クロマト法と SmartAmp 法で共に「陰性」と判定された。一方、免疫クロマト法で「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定されたのは３検体。免疫クロマト法で A 型インフルエンザ「陽性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陰性」と判定されたケース（偽陰性）は無かった。

免疫クロマト法で A 型インフルエンザ「陰性」と判定されて、SmartAmp 法で新型インフルエンザ「陽性」と判定された３検体については特に、ウイルスゲノムの塩基配列解析および定量的 RT-PCR によって SmartAmp 法の結果を検証して、その結果を裏付けるデータを得た。したがって臨床検体を用いても、SmartAmp 法は免疫クロマト法よりも感度が高いと結論づけられた。

ウイルスゲノムの塩基配列解析によって SmartAmp 法の結果を検証するために、Swab 検体からまず RNA を抽出し、引き続いてマルチセグメント RT-PCR を行った。A 型インフルエンザウイルスの分節は 5’-および 3’-末端に共通シークエンスを持つので、5’-ACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG-3’ および 5’-ACGCGTGATCAGTAGAAAGG-3’のプライマーを用いてマルチセグメント RT-PCR を行い、その産物を鋳型として分節特異的な PCR を実施した。そして HA 分節 (H1)と NA 分節の塩基配列を解析した。合計３１検体のうち１６検体において、シークエンス解析を実施することができた。NA 分節のシークエンス解析では、タミフル耐性およびリレンザ耐性の変異は見つからなかった。また、１６検体のうち５検体において、HA 分節(H1)に変異が発見されたが、その変異による SmartAmp 法の感度に対する影響はほとんどないと考えられた。

14. 謝　辞

本臨床研究を実施するにあたり、ご協力を頂いた関係の方々に心より感謝申し上げます。

15. 参考文献

1. Neumann G, Noda T & Kawaoka Y (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature 459(7249): 931-939.
2. Novel Swine-Origin Influenza A/H1N1 Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM. (2009) Emergence of a novel swine-origin influenza A/H1N1 virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 360(25):2605-2615.. Erratum in: *N Engl J Med.* 2009 361(1):102.
3. Krug RM & Aramini JM (2009) Emerging antiviral targets for influenza A virus. *Cell* 30(6): 269-277.
4. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y. (2009) In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*. 460(7258):1021-1025.
5. Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, Wadford DA, Pappas C, Zeng H, Gustin KM, Pearce MB, Viswanathan K, Shriver ZH, Raman R, Cox NJ, Sasisekharan R, Katz JM, Tumpey TM. (2009) Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A/H1N1 influenza viruses in ferrets and mice. *Science*. 325(5939):484-487.
6. Mitani, Y., Lezhava, A., Kawai, Y., Kikuchi, T., Oguchi-Katayama, A., Kogo, Y., Itoh, M., Miyagi, T., Takakura, H., Hoshi, K.*, et al.* (2007) Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nat. Methods* 4(3), 257-262.
7. Mitani Y, Lezhava A, Sakurai A, Horikawa A, Nagakura M, Hayashizaki Y, and Ishikawa T. A rapid and cost-effective SNP detection method: Application of SmartAmp2 to pharmacogenomics research. (2009) *Pharmacogenomics* 10(7): 1187-1197.
8. Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, St George K, Hatta M, Kawaoka Y, Wentworth DE. (2009) Single Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J. Virol.* 83(19):10309-10313.
9. Hurt AC, Holien JK, Parker M, Kelso A, Barr IG (2009) Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel meuraminidase mutation. *J. Virol.* 83(20):10366-10373.

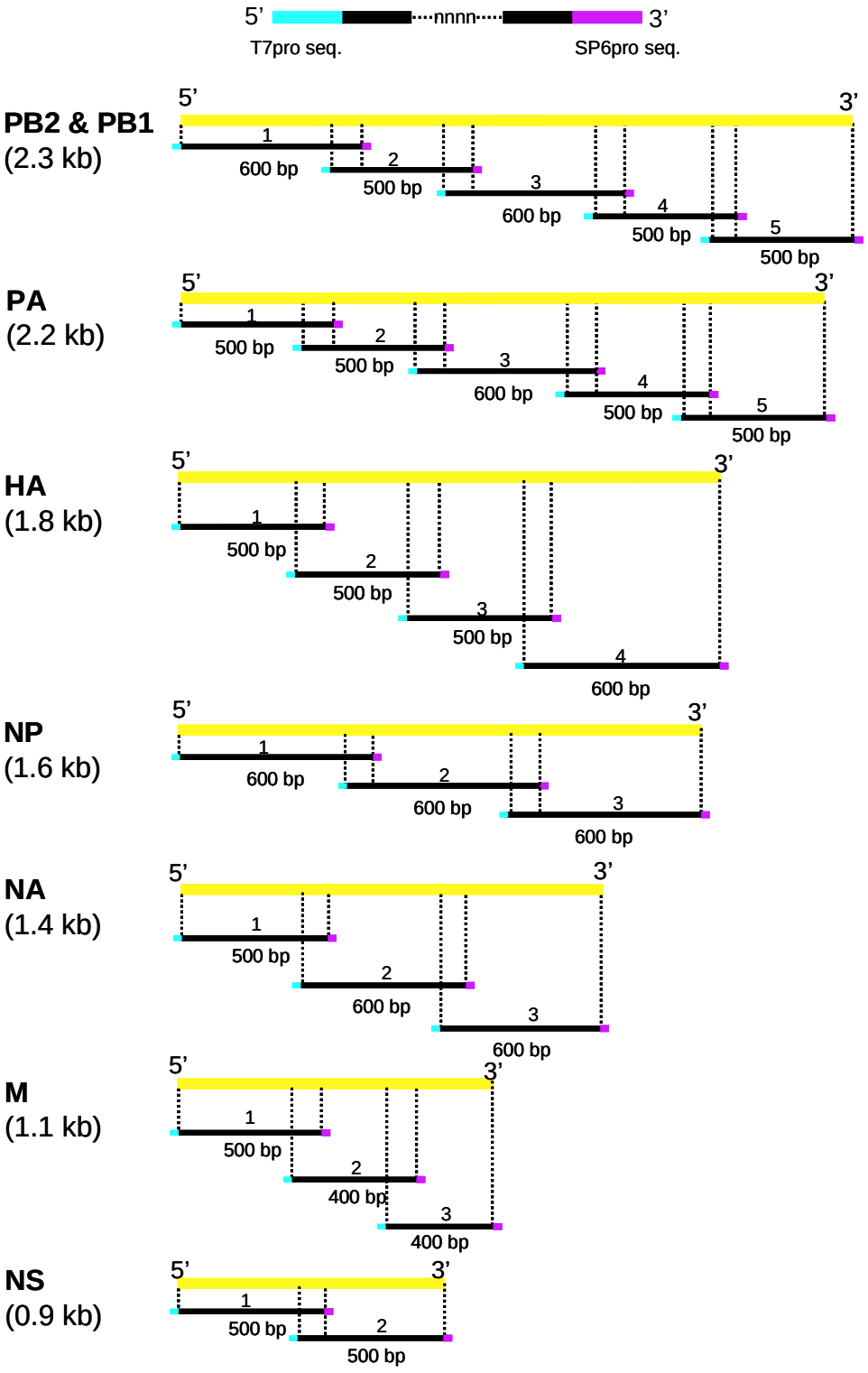
添付資料１：　いすみ医療センターにおける臨床研究の結果一覧

検体番号	免疫クロマト	SmartAmp	被験者識別番号	性別・年齢	担当医師	同意書・診察日時	診察時体温	発熱開始日	発熱後時間	集団感染	薬の服用	症状
IS-024 (11/14)	A (-)	新型 (-)	69318	女・17	佐野英樹	11/14午前11時半	38.5	11/13午後10時	13時間半	患者の周囲	あし	咳
IS-034 (10/24)	A (-)	新型 (-)	82945	男・16	佐野英樹	10/24午前11時半	36.7	10月23日	1日	なし	なし	記述なし
IS-058	A (-)	新型 (-)	86112	男・43	柴田貴久	10/20午前	37.6	10/18午前1時	2日	咳する人と同席	なし	発熱・咽頭痛・間接痛・倦怠感
IS-064	A (-)	新型 (-)	82519	男・35	柴田貴久	11/10午前9時半	38	11/10午前8時	1時間	なし	なし	発熱
IS-070 (11/5)	A (-)	新型 (-)	51690	女・18	佐野英樹	11/5午前11時	38	11/4午後6時	18時間	なし	なし	咳・咽頭痛・頭痛
IS-081	A (-)	新型 (-)	83812	男・36	柴田貴久	10/20午前	37.2	10/18午前	2日	なし	なし	発熱・咽頭痛・鼻汁・頭痛
IS-084	A (-)	新型 (-)	5758	男・35	岩佐亮太	11/9午前10時	38.2	11月8日	1日	なし	なし	発熱・咳・喀痰・頭痛
IS-087	A (-)	新型 (-)	93809	女・39	岩佐亮太	11/9午前10時	37.1	11/6午前	3日	なし	なし	発熱・咳
IS-100 (10/23)	A (-)	新型 (-)	41346	女・22	岩佐亮太	10/23午前11時	37	10月22日	1日	患者の周囲	なし	発熱・咳・鼻汁・頭痛
IS-115	A (-)	新型 (-)	7958	女・35	岩佐亮太	11/16午前11時	37.3	11/15午後2時	21時間	なし	なし	発熱・咽頭痛・鼻汁・鼻閉・倦怠感
IS-116	A (-)	新型 (-)	44202	男・80	岩佐亮太	11/16午前11時	37.9	11月15日	1日	なし	なし	発熱・倦怠感
IS-117	A (-)	新型 (-)	8249	女・36	岩佐亮太	11/16午前11時	37.2	11/15午前	1日	なし	なし	頭痛・間接痛
IS-118	A (-)	新型 (-)	33430	男・57	岩佐亮太	11/16午前11時	36.7	11月13日	3日	同居人の周囲	あり	咳・咽頭痛・鼻汁
IS-124 (11/16)	A (-)	新型 (-)	52014	男・38	岩佐亮太	11/16午前11時半	37.8	11/15午前	1日	なし	なし	発熱・咳・咽頭痛・喀痰・鼻汁・間接痛
IS-124 (11/19)	A (-)	新型 (-)	96474	男・33	佐野英樹	11/19午前11時	37	11月16日	3日	患者の周囲	なし	発熱・咳・喀痰・鼻汁・倦怠感
IS-125	A (-)	新型 (-)	64737	女・15	佐野英樹	11/19午前11時	37.5	11/8午後8時	15時間	患者の周囲	なし	咳・咽頭痛・鼻汁
IS-140	A (-)	新型 (-)	34407	女・48	佐野英樹	11/12午前10時半	36.9	11/11午後9時	13時間半	患者の周囲	なし	記述なし
IS-147	A (-)	新型 (-)	44593	男・40	岩佐亮太	11/2午後1時	36.6	10月31日	2日	患者の周囲	ヒダントール	発熱・鼻汁
IS-026	A (-)	新型(+)	96498	女・23	伴　俊明	11/21午前10時	36.7	11月19日	2日	なし	タミフル	発熱・咳・咽頭痛
IS-113	A (-)	新型(+)	67885	女・16	岩佐亮太	11/13午後4時	38.1	11/13午前6時	10時間	患者の周囲	なし	発熱・咳・咽頭痛・鼻汁・頭痛・間接痛
IS-146	A (-)	新型(+)	75146	女・34	岩佐亮太	11/2午後1時	37.4	11/1午後	1日	患者の周囲	デパケン・デパス	発熱・咳・頭痛
IS-004 (11/15)	A (+)	新型 (+)	60953	男・15	大森敏生	11/15午前9時半	38.6	11月14日	1日	患者の周囲	なし	発熱
IS-021	A (+)	新型 (+)	81249	男・18	伴　俊明	11/21午前10時	37.2	11月20日	1日	患者の周囲	なし	発熱・咳・咽頭痛・鼻汁・頭痛・間接痛・倦怠感
IS-022	A (+)	新型 (+)	59249	女・19	伴　俊明	11/21午前10時	39	11/21午前	6時間	患者の周囲	なし	発熱・咳・鼻閉
IS-024 (11/20)	A (+)	新型 (+)	90159	女・17	伴　俊明	11/21午前10時	38.6	11/20午後	1日	患者の周囲	なし	発熱・咳・咽頭痛・頭痛・間接痛・倦怠感
IS-025	A (+)	新型 (+)	59638	男・16	岩佐亮太	11/14午前11時半	39.3	11/13午後5時	18時間半	患者の周囲	なし	発熱・咽頭痛・頭痛・間接痛・倦怠感
IS-085 (10/20)	A (+)	新型 (+)	77544	女・16	柴田貴久	10/20午前	38	10/19午後8時	14時間	同居人の周囲	なし	発熱・咳・咽頭痛・喀痰・鼻汁・頭痛・倦怠感
IS-085 (11/9)	A (+)	新型 (+)	57466	女・36	岩佐亮太	11/9午前10時	38.8	11/9午前6時	4時間	なし	なし	咳・鼻汁
IS-116 (11/12)	A (+)	新型 (+)	79648	女・16	佐野英樹	11/12午前10時半	38.3	11/11午後4時	18時間半	患者の周囲	なし	発熱・咳・咽頭痛・喀痰・鼻汁・鼻閉・倦怠感
IS-128	A (+)	新型 (+)	67340	女・16	柴田貴久	11/24午前10時	39.5	11/23午後	1日	患者の周囲	なし	発熱・咳・咽頭痛・鼻汁・倦怠感
IS-129	A (+)	新型 (+)	76367	女・38	柴田貴久	11/24午前10時	37.4	11月23日	1日	患者の周囲	なし	発熱・咳・間接痛・倦怠感
31	富士レビオ											

添付資料２：　免疫クロマト・SmartAmp・のシークエンス解析結果の比較

検体番号	免疫クロマト	SmartAmp	シークエンス解析	変異
IS-4 (11/15)	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	OP(f)プライマー結合部位に変異
IS-21	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-22	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-24 (11/14)	(-)	(-)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-24 (11/20)	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	OP(f)プライマー結合部位に変異
IS-25	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	OP(f)プライマー結合部位に変異
IS-26	(-)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-34 (10/24)	(-)	(-)	no amplification product	
IS-58	(-)	(-)	no amplification product	
IS-64	(-)	(-)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-70 (11/5)	(-)	(-)	2009 pandemic influenza A/H1N1	OP(r)プライマー結合部位に変異
IS-81	(-)	(-)	no amplification product	
IS-84	(-)	(-)	no amplification product	
IS-85 (10/20)	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-85 (11/9)	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-87	(-)	(-)	no amplification product	
IS-100 (10/23)	(-)	(-)	no amplification product	
IS-113	(-)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-115	(-)	(-)	no amplification product	
IS-116	(-)	(-)	no amplification product	
IS-116 (11/12)	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-117	(-)	(-)	no amplification product	
IS-118	(-)	(-)	2009 pandemic influenza A/H1N1	OP(f)プライマー結合部位に変異
IS-124 (11/16)	(-)	(-)	no amplification product	
IS-124 (11/19)	(-)	(-)	no amplification product	
IS-125	(-)	(-)	no amplification product	
IS-128	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-129	A (+)	新型(+)	2009 pandemic influenza A/H1N1	
IS-140	(-)	(-)	no amplification product	
IS-146	(-)	新型(+)	no amplification product	
IS-147	(-)	(-)	no amplification product	

添付資料３：　分節特異的 PCR の増幅範囲



添付資料４：　分節特異的 PCR のプライマー塩基配列

分節	PCR部位	プライマー名	プライマー塩基配列 (5'→3')
PB2	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6PB2r1	atttaggtgacactatagaaGCCAGCTGTGACTCTGATGT
	2	T7PB2f2	taatacgactcactatagggTAAGGAGGAGAGTTGATACA
	2	SP6PB2r2	atttaggtgacactatagaaTGTGCTGTGGCACATTTCCA
	3	T7PB2f3	taatacgactcactatagggGGAGAAGTGAGAAATGATGA
	3	SP6PB2r3	atttaggtgacactatagaaATGGATTCAATTCCCCAGTT
	4	T7PB2f4	taatacgactcactatagggTAGGGGCGATCTGAACTTTG
	4	SP6PB2r4	atttaggtgacactatagaaTGCCTTAGGGACAAGAGACT
	5	T7PB2f5	taatacgactcactatagggAACACTTATCAATGGATAAT
	5	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
PB1	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6PB1r1	atttaggtgacactatagaaATTAGCTGTTAGGCCATTCG
	2	T7PB1f2	taatacgactcactatagggACAAACAAGGGTAGATAAAC
	2	SP6PB1r2	atttaggtgacactatagaaTGCTCCTAGCTAAAGTTTCA
	3	T7PB1f3	taatacgactcactatagggATAAGAGCACTGACATTAAA
	3	SP6PB1r3	atttaggtgacactatagaaTTGTCCAAGATTCAGTATCG
	4	T7PB1f4	taatacgactcactatagggATTGAGAAAATAAGGCCTCT
	4	SP6PB1r4	atttaggtgacactatagaaTGTGTATCTGTAGTCTTTGA
	5	T7PB1f5	taatacgactcactatagggACATGAGTATTGGAGTAACA
	5	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
PA	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6PAr1	atttaggtgacactatagaaAAAGGAATCCCATAGACTCC
	2	T7PAf2	taatacgactcactatagggTGGCCACCAAAGCGGACTAC
	2	SP6PAr2	atttaggtgacactatagaaGGTCTTCAATACTTAATTTC
	3	T7PAf3	taatacgactcactatagggGAAGTGAACGCCAAAATTGA
	3	SP6PAr3	atttaggtgacactatagaaCTTCATTATGTATTCAGTAG
	4	T7PAf4	taatacgactcactatagggTGATTCAAGCTGGATAGAAC
	4	SP6PAr4	atttaggtgacactatagaaTGCTCTCAATCTGCTGAAGA
	5	T7PAf5	taatacgactcactatagggGCCAAGTGTCGAGGCCCATG
	5	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
HA	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6HAr1	atttaggtgacactatagaaTGTTCGAGTCATGATTGGGC
	2	T7HAf2	taatacgactcactatagggGATTATGAGGAGCTAAGAGA
	2	SP6HAr2	atttaggtgacactatagaaGATCCAGCATTTCTTTCCAT
	3	T7HAf3	taatacgactcactatagggACTGGACACTAGTAGAGCCG
	3	SP6HAr3	atttaggtgacactatagaaCTCTTTACCTACTGCTGTGA
	4	T7HAf4	taatacgactcactatagggCGACCTGAAGAGCACACAGA
	4	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
NP	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6NPr1	atttaggtgacactatagaaTTCACCGCAGCACCTGCGGC
	2	T7NPf2	taatacgactcactatagggTGATGCCACATATCAGAGAA
	2	SP6NPr2	atttaggtgacactatagaaGGAATCACTTTCTTTCCTCT
	3	T7NPf3	taatacgactcactatagggAAGTGGTCAGCCTGATGAGA
	3	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
NA	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6NAr1	atttaggtgacactatagaaATTAGGGTTCGATATGGGCT
	2	T7NAf2	taatacgactcactatagggCCTTGGAATGCAGAACCTTC
	2	SP6NAr2	atttaggtgacactatagaaGATTGTCTCCGAAAATCCCA
	3	T7NAf3	taatacgactcactatagggAAAGGGAAAGATAGTCAAAT
	3	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
M	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6MPr1	atttaggtgacactatagaaTCAGCAATCTGTTCACAAGT
	2	T7MPf2	taatacgactcactatagggCACTTGCCAGTTGCATGGGC
	2	SP6MPr2.	atttaggtgacactatagaaCGAGAGGATCACTTGAATCG
	3	T7MPf3	taatacgactcactatagggCTAGCTCCAGTGCTGGTCTG
	3	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG
NS	1	T7uni-12	taatacgactcactatagggACGCGTGATCAGCAAAAGCAGG
	1	SP6NSr1	atttaggtgacactatagaaAACTATTGCTCCCTCCTCAG
	2	T7NSf2	taatacgactcactatagggCGATTGGACCAGGCGATCAT
	2	SP6uni-13	atttaggtgacactatagaaACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG

添付資料５：　シークエンス解析で発見された変異：
検体 IS-4 (11/5), IS-24 (11/20), IS-25, IS-70 (11/5), IS-118

IS-4 (11/15)

INF0218 (IS-4 (11/15))

Segment	working passes	Subtype	# of mutation(s)	Effect of mutation(s)
HA (fragment 2)	2/2	H1 pandemic	5	One in 5 ' of OPf
HA (fragment 3)	2/2			
NA (fragment 2)	2/2	N1 pandemic	0	

> HA fragment 2 and 3 sequence

H1N1(new)_HA.txt: consensus sequence used for alignment

GATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTCATCATTTGAAAGGTTTGAGATATTCCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGCGTAACGGCAGCATGTC
CTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATG
GGGCATTCACCATCCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTCTTTGTGGGGACATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAATAGCAATAAGA
CCCAAAGTGAGGGATCAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACAATAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTCGAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTCGCAATGG
AAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACTTGTCAGACACCCAAGGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTTCAGAATATACATCCGAT
CACAATTGGAAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCATTGAA
GGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCAACATCAAAATGAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTACTAACAAAG
TAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTC

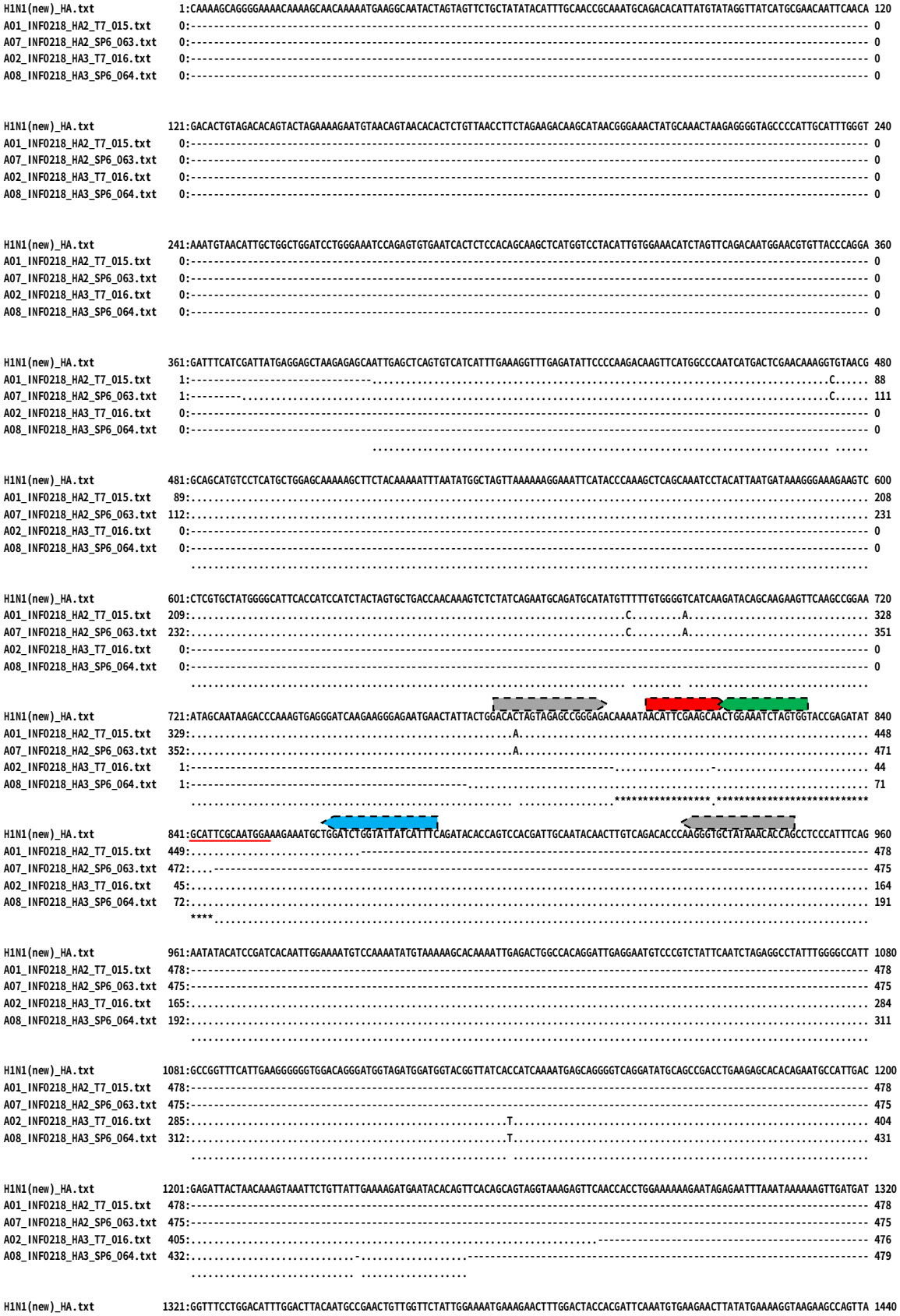
> NA fragment 2 sequence

H1N1(new)_NA.txt: consensus sequence used for alignment
CAA: zanamivir (relenza) resistance site (CAA>AAA ; Q136K)
CAC: oseltamivir (tamiflu) resistance site (CAC>TAC ; H274Y)

CCTTGGAATGCAGAACCTTCTTCTTGACTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAGACAGGAGCCCATATCGAACCCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCCTCTCC
ATACAACTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTCATGATGGCATCAATTGGCTAACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAACGGCATAATA
ACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACTGTAATGACCGATGGACCAAGTGATGGACAGGCCTCATACAAGATCT
TCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTC
GAATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTTTCGGAGACAATC

HA

H1N1(new)_HA.txt: consensus sequence used for alignment



IS-24 (11/20)

NF0222 (IS-24 (11/20))

Segment	working passes	Subtype	# of mutation(s)	Effect of mutation(s)
HA (fragment 2)	2/2	H1 pandemic	5	One in 5 ' of OPf
HA (fragment 3)	2/2			
NA (fragment 2)	2/2	N1 pandemic	0	Not known as drug resistance mutation

> HA fragment 2 and 3 sequence

H1N1(new)_HA.txt: consensus sequence used for alignment

GATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTCATCATTTGAAAGGTTTGAGATATTCCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGCGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAAT
TTAATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTCACCATCCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATAT
GTCTTTGTGGGGACATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACAATAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTCGAAGCAACTGGAAATCTAGTG
GTACCGAGATATGCATTCGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACTTGTCAGACACCCAAGGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTTCAGAATATACATCCGATCACAATT
GGAAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTAT
CATCATCAAAATGAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTACTAACAAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTC

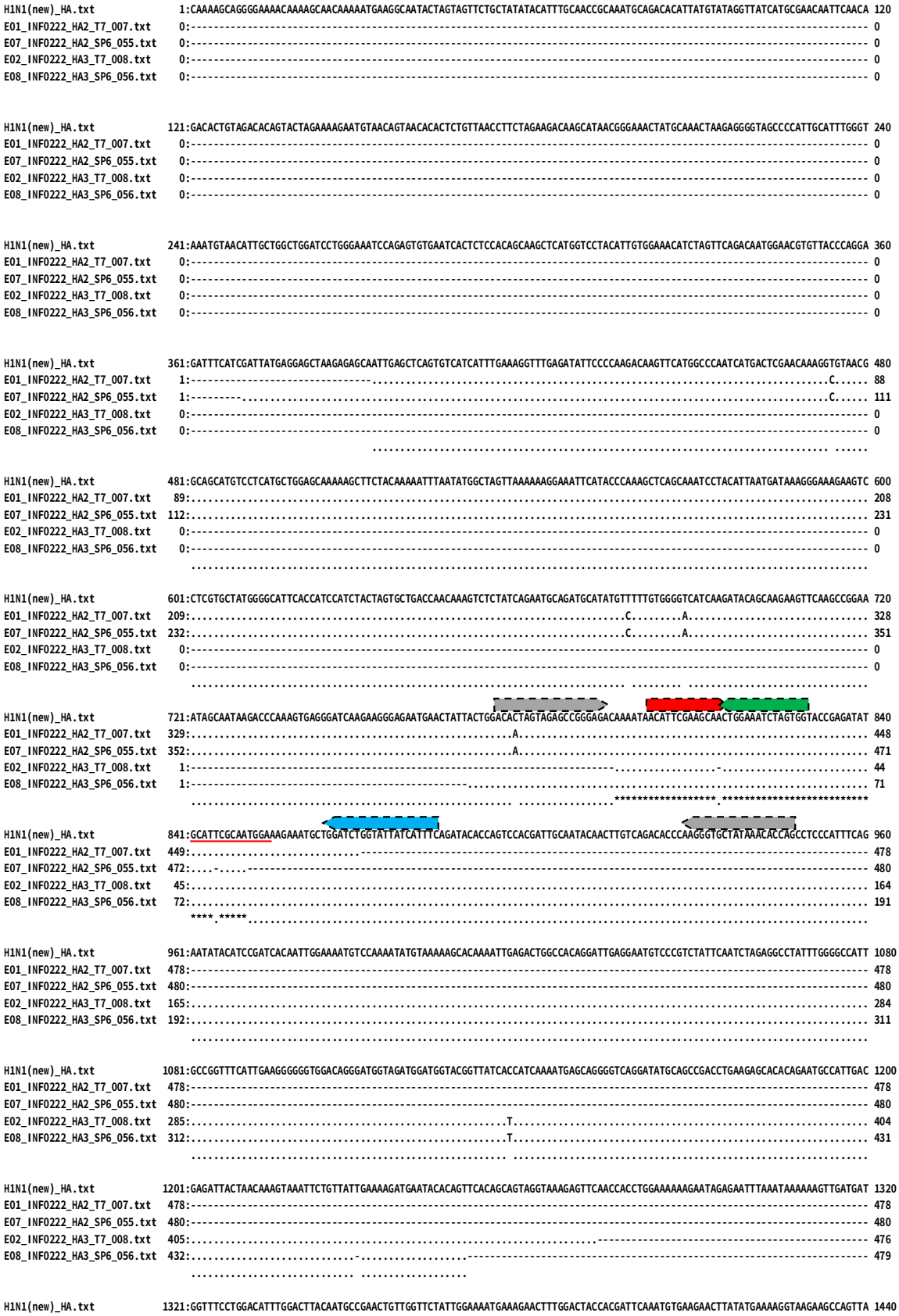
> NA fragment 2 sequence

H1N1(new)_NA.txt: consensus sequence used for alignment
CAA: zanamivir (relenza) resistance site (CAA>AAA ; Q136K)
CAC: oseltamivir (tamiflu) resistance site (CAC>TAC ; H274Y)

CCTTGGAATGCAGAACCTTCTTCTTGACTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAGACAGGAGCCCATATCGAACCCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCCTCTCCATACAACTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAG
CAAGTGCTTGTCATGATGGCATCAATTGGCTAACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAACGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATG
GTTCTTGCTTTACTGTAATGACCGATGGACCAAGTGATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTG
TGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTTTCGGAGACAATC

HA

H1N1(new)_HA.txt: consensus sequence used for alignment



IS-25

INF0223 (IS-25)

Segment	working passes	Subtype	# of mutation(s)	Effect of mutation(s)
HA (fragment 2)	2/2	H1 pandemic	5	One on 5 ' of OPf
HA (fragment 3)	2/2			
NA (fragment 2)	2/2	N1 pandemic	0	Not known as drug resistance mutation

> HA fragment 2 and 3 sequence

H1N1(new)_HA.txt: consensus sequence used for alignment

GATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTCATCATTTGAAAGGTTTGAGATATTCCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGCGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAAT
TTAATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTCACCATCCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATAT
GTCTTTGTGGGGACATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACAATAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTCGAAGCAACTGGAAATCTAGTG
GTACCGAGATATGCATTCGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACTTGTCAGACACCCAAGGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTTCAGAATATACATCCGATCACAATT
GGAAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTAT
CATCATCAAAATGAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTACTAACAAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTC

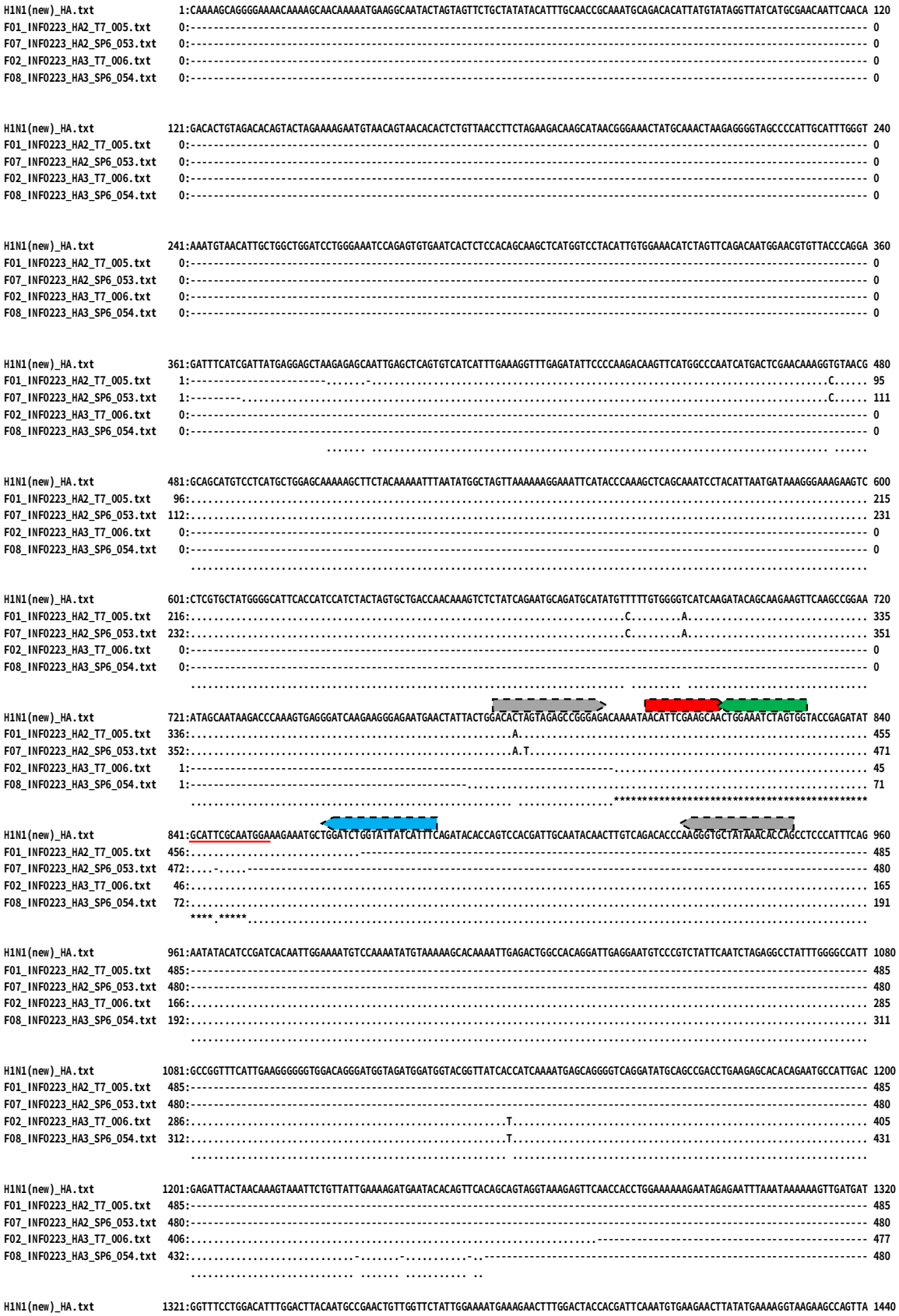
> NA fragment 2 sequence

H1N1(new)_NA.txt: consensus sequence used for alignment
CAA: zanamivir (relenza) resistance site (CAA>AAA ; Q136K)
CAC: oseltamivir (tamiflu) resistance site (CAC>TAC ; H274Y)

CCTTGGAATGCAGAACCTTCTTCTTGACTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAGACAGGAGCCCATATCGAACCCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCCTCTCCATACAACTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAG
CAAGTGCTTGTCATGATGGCATCAATTGGCTAACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAACGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATG
GTTCTTGCTTTACTGTAATGACCGATGGACCAAGTGATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTG
TGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTTTCGGAGACAATC

HA

H1N1(new)_HA.txt: consensus sequence used for alignment



IS-70 (11/5)

INF0229 (IS-70 (11/5))

Segment	working passes	Subtype	# of mutation(s)	Effect of mutation(s)
HA (fragment 2)	2/2	H1 pandemic	3	Has mutation in region of SmartAmp primers (at the beginning of OP-r)
HA (fragment 3)	2/2			
NA (fragment 2)	2/2	N1 pandemic	0	Not known as drug resistance mutation

> HA fragment 2 and 3 sequence

H1N1(new)_HA.txt: consensus sequence used for alignment

GATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTCATCATTTGAAAGGTTTGAGATATTCCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAAT
TTAATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTCACCATCCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATAT
GTTTTTGTGGGGACATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACACTAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTCGAAGCAACTGGAAATCTAGTG
GTACCGAGATATGCATTCGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACTTGTCAGACACCCAAAGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTTCAGAATATACATCCGATCACAATT
GGAAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTAT
CACCATCAAAATGAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGGGATTACTAACAAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTC

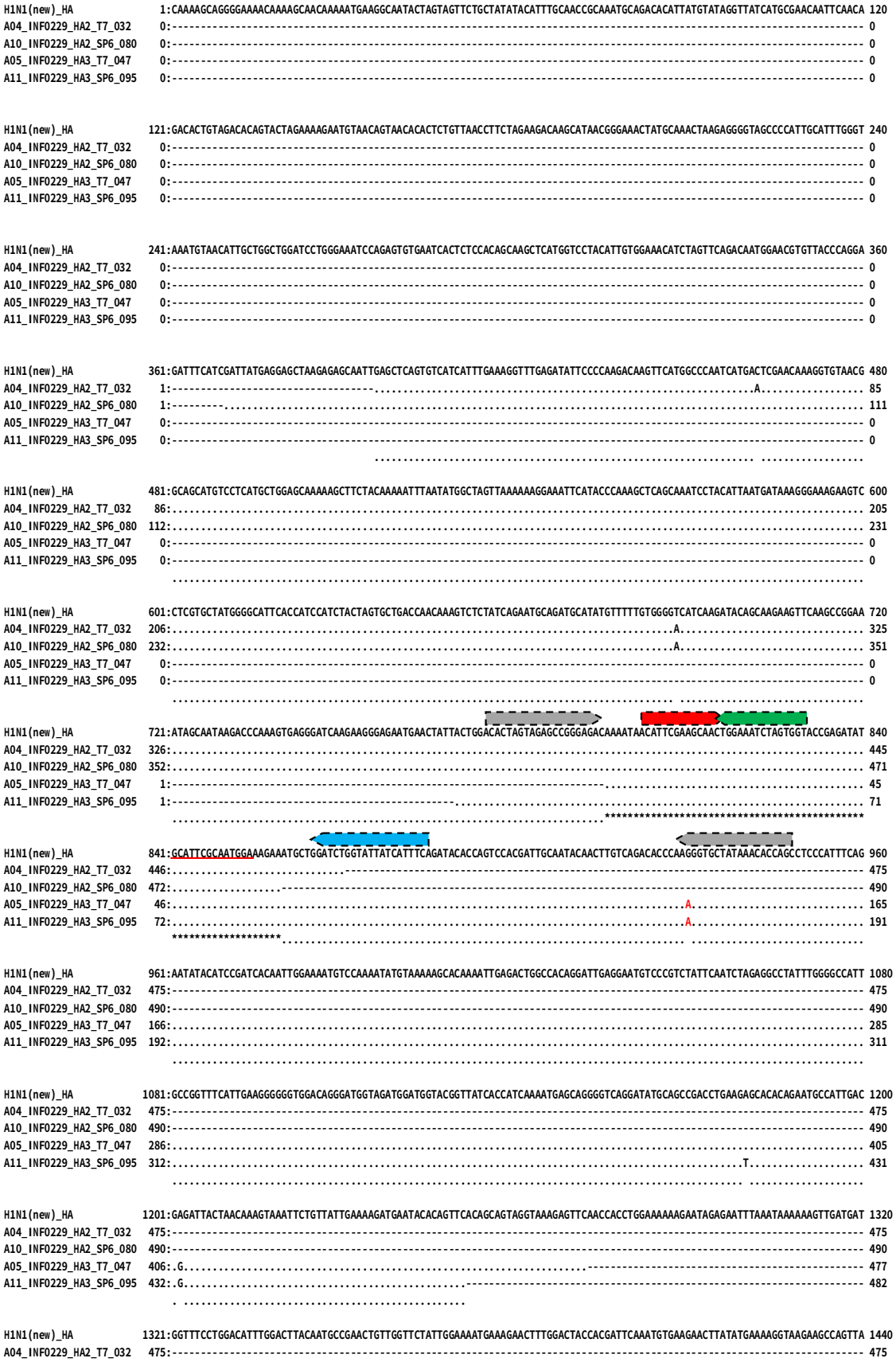
> NA fragment 2 sequence

H1N1(new)_NA.txt: consensus sequence used for alignment
CAA: zanamivir (relenza) resistance site (CAA>AAA ; Q136K)
CAC: oseltamivir (tamiflu) resistance site (CAC>TAC ; H274Y)

CCTTGGAATGCAGAACCTTCTTCTTGACTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAGACAGGAGCCCATATCGAACCCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCCTCTCCATACAACTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAG
CAAGTGCTTGTCATGATGGCATCAATTGGCTAACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAACGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATG
GTTCTTGCTTTACTGTAATGACCGATGGACCAAGTGATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTG
TGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTTTCGGAGACAATC

HA

H1N1(new)_HA.txt: consensus sequence used for alignment



IS-118

INF0242 (IS-118)

Segment	working passes	Subtype	# of mutation(s)	Effect of mutation(s)
HA (fragment 2)	2/2	H1 pandemic	5	One in 5 ' of OPf
HA (fragment 3)	2/2			
NA (fragment 2)	2/2	N1 pandemic	0	Not known as drug resistance mutation

> HA fragment 2 and 3 sequence

H1N1(new)_HA.txt: consensus sequence used for alignment

GATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTCATCATTTGAAAGGTTTGAGATATTCCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGCGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAAT
TTAATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTCACCATCCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATAT
GTCTTTGTGGGGACATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACAATAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTCGAAGCAACTGGAAATCTAGTG
GTACCGAGATATGCATTCGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACTTGTCAGACACCCAAGGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTTCAGAATATACATCCGATCACAATT
GGAAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTAT
CATCATCAAAATGAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACACAGAATGCCATTGACGAGATTACTAACAAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTC

> NA fragment 2 sequence

H1N1(new)_NA.txt: consensus sequence used for alignment
CAA: zanamivir (relenza) resistance site (CAA>AAA ; Q136K)
CAC: oseltamivir (tamiflu) resistance site (CAC>TAC ; H274Y)

CCTTGGAATGCAGAACCTTCTTCTTGACTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAGACAGGAGCCCATATCGAACCCTAATGAGCTGTCCTATTGGTGAAGTTCCCTCTCCATACAACTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAG
CAAGTGCTTGTCATGATGGCATCAATTGGCTAACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAACGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATG
GTTCTTGCTTTACTGTAATGACCGATGGACCAAGTGATGGACAGGCCTCATACAAGATCTTCAGAATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCCTAATTATCACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGAAATCACATGTG
TGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTTTCGGAGACAATC

HA

H1N1(new)_HA.txt: consensus sequence used for alignment